Irina Gostin

BIOMARKERI STRUCTURALI LA PLANTE

III 25.008

Editura Universităţii „Alexandru Ioan Cuza" Iaşi

Irina Gostin

BIOMARKERI STRUCTURALI LA PLANTE

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Carte apărută în cadrul Grantului CEEX 640/2005 (programul MENER)

Referenți științifici:

Prof.dr. Maria Magdalena Zamfirache

Conf. dr. Lăcrămioara Ivănescu

Redactor: Mariana Pricop
Coperta: Manuela Oboroceanu

ISBN: 978 – 973 – 703 – 291 – 1

© Editura Universității „Alexandru Ioan Cuza", 2007
700511 – Iaşi, str. Păcurari nr. 9, tel./fax: (0232) 314947

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

497499

IRINA GOSTIN

BIOMARKERI STRUCTURALI LA PLANTE

432196
B.C.U. IASI

ALE

EDITURA UNIVERSITĂȚII „ALEXANDRU IOAN CUZA“
IAȘI – 2007

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Descrierea CIP a Bibliotecii Naționale a României
GOSTIN, IRINA

Biomarkeri structurali la plante/ Irina Gostin. - Iași: Editura Universității „Al.I.Cuza", 2007
Bibliogr.
ISBN: 978–973– 703–291–1

57:58

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUPRINS

I. Morfogeneza la plante – rezultanta interacțiunii dintre genotip şi mediu / 7

I.1. Meristemele şi pattern-ul structural al plantelor / 9

I.2. Adaptarea plantelor la stresul indus de mediu / 17

II. Bioindicatorii poluării atmosferice – aplicații şi limitări / 19

II.1. Clasificarea metodelor biologice utilizate în investigarea poluării atmosferice / 21

II.2. Bioindicatorii / 24

II.2.1. Exemple de bioindicatori şi limitele utilizării lor în diagnosticarea ecosistemelor / 25

II.3. Markerii biologici ai stresului şi relația cauză-efect / 30

II.3.1. Stabilirea relației cauză-efect / 32

II.3.2. Utilizarea markerilor biologici în studiile experimentale / 34

II.3.3. Evaluarea gradului de afectare a vegetației / 35

II.3.4. Studiile de expunere controlată / 36

II.3.5. Experimentele pentru determinarea mecanismelor relației cauză-efect / 37

II.3.6. Strategii de utilizare a biomarkerilor în evaluarea gradului de stres din ecosisteme / 38

III. Suprafața foliară – biomonitor în poluarea atmosferică cu pulberi / 45

III.1. Identificarea microparticulelor implicate în procesele de poluare / 53

III.2. Cuticula şi interacțiunea ei cu poluanții atmosferici / 62

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

IV. Modificări induse de stres în metabolismul fenil-propanilor/ 69

IV.1. Funcțiile fenilpropanoizilor induşi de stres / 71

IV.2. Localizarea celulară a biosintezei fenilpropanoizilor / 74

IV.3. Mecanisme de toleranță a plantelor la poluarea cu metale grele / 77

IV.4. Identificarea histochimică a fenolilor / 81

V. Markeri biologici morfologici, structurali şi ultrastructurali utilizați pentru evaluarea impactului antropic asupra ecosistemelor / 85

V.1. Markeri morfologici / 87

V.1.1. Studii de caz / 91

V.2. Markeri structurali şi ultrastructurali / 98

V.2.1. Studii de caz – observații în mediul natural / 102

V.3. Studiu de caz – Parcul național Ceahlău şi zona limitrofă / 142

BIBLIOGRAFIE / 163

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

I. Morfogeneza la plante – rezultanta interacțiunii dintre genotip şi mediu

O privire rapidă asupra lumii vegetale ne relevă extraordinara varietate manifestată de plante în cursul dezvoltării lor. Pe lângă o mare varietate de forme şi mărimi, evidente la diferite specii, se remarcă şi plasticitatea în dezvoltare a aparatului vegetativ şi de reproducere la indivizi din aceeaşi specie.

Plasticitatea manifestată în cursul procesului de diferențiere reprezintă o adaptare a plantelor la viața staționară pe care o au în habitatul lor, aceasta permițându-le, alături de procesul de creştere continua, să îşi extindă suprafețele implicate în preluarea nutrienților şi în captarea luminii solare. Acestea se pot realiza prin extinderea sistemului radicular, prin formarea de noi rădăcini şi de peri absorbanți, prin mărirea numărului de frunze şi a suprafeței foliare.

Deoarece nu se pot mişca, precum animalele, plantele trebuie să facă mereu față condițiilor staționare de mediu în care îşi duc existența, să fie capabile să producă gameți şi să facă trecerea spre următoarea generație. Ca urmare, presiunea mediului înconjurător poate avea o influență majoră asupra fenotipului individual, afectând adesea dimensiunile plantei, numărul şi mărimea organelor sale. În alte cazuri, mediul poate influența mai subtil indivizii vegetali, cauzând modificări la nivel structural şi ultrastructural. În contact cu factorii de mediu, în organismul vegetal se realizează un echilibru între programul genetic care descrie modelul de bază şi modificările survenite ca urmare a adaptării la condițiile concrete; acestea din urmă au un rol determinant asupra momentelor „critice" ale dezvoltării, cum ar fi tranziția de la starea

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

vegetativă la cea reproducătoare, trecerea semințelor de la faza de dormanță la cea de germinare etc.

Plantele cresc în urma activității țesuturilor meristematice care produc celulele din componența organelor lor vegetative şi de reproducere. În urma diviziunilor repetate ce au loc în aceste țesuturi se produce „materia primă" utilizată apoi în procesul de morfogeneză. Forma finală a diverselor organe este rezultanta creşterii orientate a celulelor şi a formării de noi elemente în țesuturile meristematice. Creşterea continuă a plantelor le oferă flexibilitate în ceea ce priveşte adaptarea permanentă la condițiile mereu schimbătoare de mediu, le ajută la maximizarea eficienței fotosintetice şi a potențialului reproductiv.

Sunt încă multe de spus în ceea ce priveşte procesul de diferențiere celulară la plante, de dobândire a identității structurale şi funcționale a celulelor din componența organismului vegetal. Deoarece celulele vegetale somatice sunt lipsite de capacitatea de mişcare, fiind imobilizate de peretele celular rigid, ele nu îşi pot schimba poziția relativă unele față de altele şi trebuie să se diferențieze în locul în care s-au format inițial. Deşi în ultima perioadă s-au făcut progrese, prin intermediul biologiei moleculare, în descifrarea modului în care o anumită celulă capătă, pe parcursul diferențierii, o identitate structurală şi funcțională (strâns legate de activitatea celulelor învecinate), mecanismele intime prin care o celulă îşi primeşte şi îşi menține această identitate sunt încă parțial necunoscute (Taylor, 1997).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

I. 1. Meristemele şi pattern-ul structural al plantelor

În cursul embriogenezei, meristemele sunt primele ţesuturi care se organizează şi prin aceasta planul general (apical-bazal) al plantei este prestabilit. Pentru a înţelege cum sunt constituite ţesuturile meristematice şi cum anume contribuie la geneza formelor organismelor vegetale, numeroşi cercetători din mari laboratoare ale lumii au desfăşurat activităţi de screening pentru a identifica mutaţiile ce cauzează modificări ale pattern-ului în timpul embriogenezei. Au fost astfel identificate gene care afectează dezvoltarea organelor axiale, atât în sens radiar cât şi în sens apical bazal, precum şi gene care controlează iniţierea şi identitatea organelor ce intră în alcătuirea embrionului. Pe măsură ce s-a reuşit clonarea acestor gene au fost desluşite multe din mecanismele ce guvernează formarea şi dezvoltarea organelor axiale, precum şi modul în care organele laterale sunt iniţiate la nivelul ţesuturilor meristematice (fig. 1) (Laux şi Jurgens, 1997).

Stadiile iniţiale ale dezvoltării zigotului la algele brune (*Fucus*) imită pe cele întâlnite la plantele superioare, mai ales în ceea ce priveşte pattern-ul iniţial al diviziunilor celulare. Kropf (1997) menţionează că investigaţiile asupra stadiilor incipiente de dezvoltare vegetativă sunt mult mai uşor de făcut la zigoţii de *Fucus* deoarece aceştia trăiesc liberi în mediul înconjurător, spre deosebire de embrionii plantelor superioare care, în primele stadii de dezvoltare, sunt complet înconjuraţi de ţesuturile plantei-mamă. De asemenea Kropf arată cum pot fi realizate diverse manipulări experimentale ale dezvoltării organelor axiale în sens apical-

BCU "M. EMINESCU" IAŞI

bazal în timpul primei diviziuni celulare ce are loc în zigotul de *Fucus*. El sugerează faptul că informațiile obținute în urma studiului detaliat al acestui mecanism de polarizare celulară poate fi extrapolat cu uşurință şi în ceea ce priveşte stadiile incipiente de dezvoltare ale zigotului de la angiosperme.

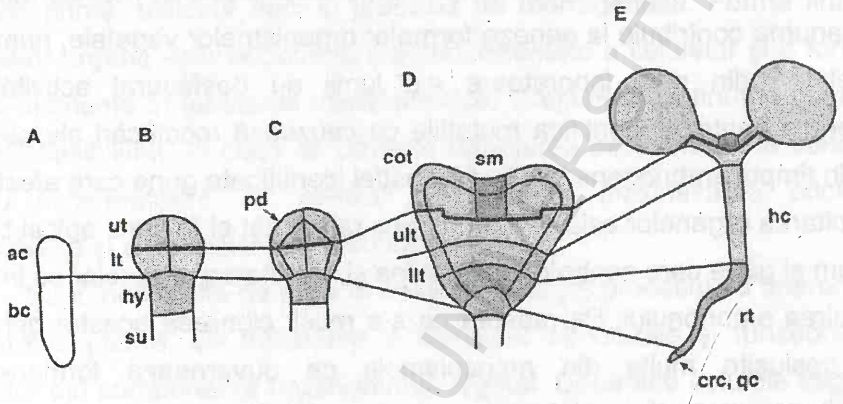


Fig. 1 – Succesiunea evenimentelor în stabilirea planului de dezvoltare a organelor vegetative la *Arabidopsis thaliana* – de la celula ou la tânăra plantulă*: A:* stadiul de două celule – o celulă mică apicală (ac) şi una mare bazală (bc) se formează în urma diviziunii asimetrice a zigotului; B; stadiul de două celule – celula apicală dă naştere la 4 celule superioare (ut) şi patru inferioare (lt); cea bazală formează hipofiza (hy) şi suspensorul (su); C – Prin diviziuni tangențiale straturile interne se separă de protoderm (pd); D – Stadiul cordiform – zona apicală ce provine din stratul de celule superioare se diferențiază în cotiledoane (co) şi meristem caulinar (sm); zona centrală, ce derivă din stratul de celule inferioare se subdivide în două straturi (ult şi llt); E – plantula tânără – hipocotilul (hc), rădăcina (rt) şi inițialele meristemului radicular sunt derivate din stratul llt; din hipofiză se formează centrul cuescent (qc) şi inițialele scufiei (crc) (Laux şi Jurgens, 1997).

Un alt studiu extins în ceea ce priveşte formarea organelor vegetative pornind de la meristemul caulinar a fost realizat de Clark (1997). Acesta evidențiază evenimentele histologice şi moleculare ce duc la

apariția diviziunilor orientate la nivelul meristemelor, precum şi activitatea unor gene care sunt cunoscute ca având un rol esențial în stabilirea şi menținerea structurii şi funcționalității țesuturilor meristematice. Celulele de la periferia meristemului apical sunt împinse pe flancuri de celulele ce iau naştere mereu în partea centrală a acestuia. Pe măsură ce meristemul continuă să crească, celulele aflate în zonele laterale ale apexului caulinar sunt setate să intre în alcătuirea primordiilor foliare şi să înceapă procesul de diferențiere.

Mai puțin cunoscute sunt mecanismele ce controlează pattern-ul pe baza căruia sunt inițiate frunzele (organe laterale) pe flancurile meristemului apical caulinar (filotaxia). Aceste momente ale morfogenezei vegetale sunt critice în ceea ce priveşte forma finală pe care o va lua fiecare individ; la rândul lor frunzele care iau naştere poartă în axilă țesuturi meristematice remanente din care se vor forma lăstari cu frunze în cursul procesului de ramificare a tulpinii, ce va avea loc ulterior. Rolul acestui țesut meristematic caulinar axilar în procesul de morfogeneză foliară nu a fost clar stabilit şi există date conform cărora prezența lui nu este strict necesară pentru ca inițierea foliară sa aibă loc. De exemplu, a fost demonstrat la *Nasturtium officinale* (Selker şi Lyndon, 1996) şi la *Begonia sp.* (Sattler şi Maier, 1997) ca frunzele, sau structuri asemănătoare frunzelor, pot lua naştere şi în absența acestui meristem. De asemenea, formarea frunzelor în absența meristemului caulinar axilar a fost frecvent observată în culturile de țesuturi *in vitro*. Studiile efectuate pe *Arabidopsis thaliana* au arătat ca alelele mutante ale genei *PINHEAD* blochează dezvoltarea meristemului axilar caulinar, dar permite dezvoltarea

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

primordiului foliar normal (McConnell şi Barton, 1995). Analizele histologice arată clar fie absența completă a acestui meristem, fie, în cazul în care el se formează în stadiile inițiale ale dezvoltării primordiului foliar, faptul că este consumat în întregime în cursul diferențierii lui.

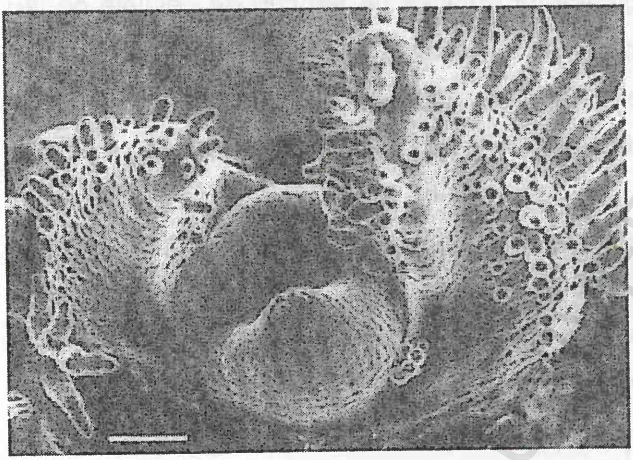


Fig. 2 - Apexul caulinar de la tutun, cu patru primordii foliare (Poething, 1977).

În lumina acestor observații Poething concluzionează că, deşi inițierea primordiilor foliare este rezultatul structurii şi fiziologiei unice a apexului caulinar, acesta nu ar fi direct implicat în acest proces. El sugerează că pe marginile apexului caulinar se organizează un țesut la nivelul căruia primordiile foliare pot emerge spontan, funcționarea apexului fiind în direcția de a produce un țesut capabil să genereze, la rândul lui frunze, mai degrabă decât producerea efectivă de primordii foliare.

Modelele biofizice au explicat într-o oarecare măsură factorii ce declanşează geneza primordiilor foliare prin tensiunile ce se acumulează în pereții celulari pe măsura creşterii în dimensiuni a țesutului meristematic (Hernandez şi Green, 1993).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Primordiile foliare apar mai întâi formate din câteva straturi de celule (în momentul în care proemină la suprafața meristemului caulinar). Ulterior ele se extind lateral prin înglobarea de celule adiționale din apexul caulinar şi pot ajunge până la înconjurarea aproape completă a acestuia (Poething, 1997).

Din punct de vedere histologic, etapele inițiale ale formării primordiilor foliare sunt legate de modificarea planurilor de diviziune atât la nivelul epidermei, cât şi în straturile mai interne ale apexului caulinar (Tiwari şi Green, 1991). Din punct de vedere molecular, semul cel mai evident al inițierii primordiului foliar este reprezentat de modificările expresiei genei *KN1 (KNOTTED1)* de la *Zea* şi ai genei similare *KNAT1(KNOTTED like)* de la *Arabidopsis*, precum şi a genei *STM (SHOOT MERISTEMLESS)* (Jakson et al, 1994, Long et al., 1996). Aceste gene (numite şi gene 1 knox) sunt active în meristemul caulinar, dar nu şi la nivelul primordiilor foliare. De aici a apărut ipoteza că reglarea activității genelor 1 knox este necesară pentru a avea loc inițierea foliară. În orice caz, inhibarea expresiei genei *KN1* reprezintă cel mai bun marker existent pentru identificarea timpurile a celulelor implicate în morfogeneza foliară la nivelul apexului caulinar (Poething, 1997).

În cursul inițierii primordiului foliar şi în stadiile incipiente ale dezvoltării acestuia se organizează teritorii distincte în lungul axelor dorso-ventrale, centro-laterale şi proximo-distale (Lu et al., 1996, Sylvester et al. 1996). Asimetria dorso-ventrală apare imediat ce primordiul foliar a fost inițiat deoarece fața adaxială este de obicei mai redusă şi concavă față de cea abaxială. Ulterior, în cursul diferențierii, axa dorso-ventrală este definită

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

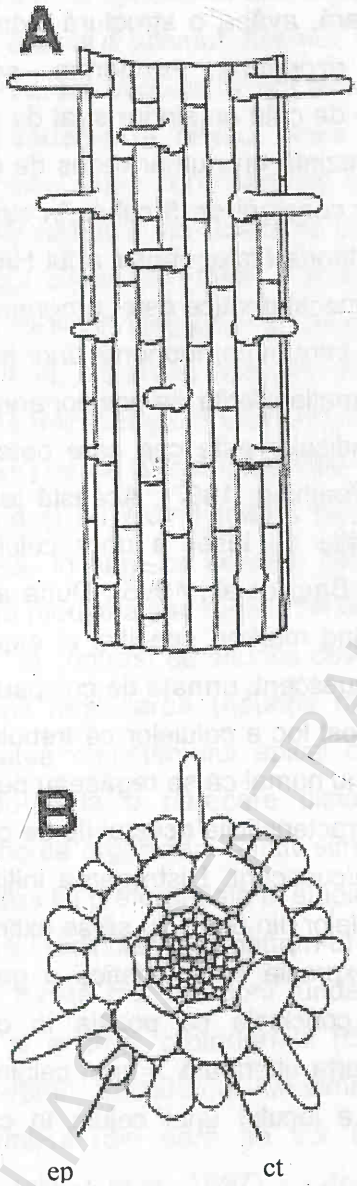
prin pattern-ul specific al diferențierii celulare. De exemplu, multe tipuri de celule (cum ar fi xilemul, floemul, mezofilul, perii, stomatele şi idioblastele) sunt localizate exclusiv la fața adaxială sau abaxială a unei frunze sau sunt mai abundente la nivelul uneia dintre ele (Nelson şi Dengler, 1997). Demarcația dintre zona centrală şi zona laterală (marginală) a unei frunze se manifestă încă din stadiul de primordiu printr-o bandă distinctă de celule în lungul zonei marginale a acestuia încă din momentul emergenței din apexul caulinar. Hegeman şi Gleissberg (1996) au denumit aceasta regiune blastozonă, deoarece termenul anterior, de meristem marginal, ar descrie anumite trăsături (cum ar fi un ritm mai intens de diviziune şi de alungire a celulelor) ce nu a fost observate la toate speciile. Celulele din blastozonă se divid şi se extind lateral pentru a forma lamina frunzei sau laciniile acesteia, în timp ce celulele din zona centrală a primordiului vor forma nervura mediană sau rahisul (în cazul frunzelor compuse).

În contrast cu situația descrisă în cazul apexului caulinar, la nivelul rădăcinii ramificarea (apariția rădăcinilor laterale) nu este generată de activitatea meristemului apical ci de cea a periciclului, locul de inițiere aflându-se la o oarecare distanță de apex. Acest fapt contribuie la menținerea organizării relativ simple a apexului radicular, ceea ce a dus la utilizarea lui preferențială în studiile de morfogeneză. O trăsătură de bază a apexului radicular este pattern-ul radiar după care sunt ordonate celulele în țesut. Există trei categorii fundamentale de meristeme la nivelul acestui apex şi anume: protodermul (din care se va forma rizoderma cu perii absorbanți), meristemul fundamental (din care va lua naştere scoarța) şi procambiul (din care se vor forma țesuturile vasculare ale rădăcinii) (Schiefelbein et al., 1997). La *Arabidopsis*, în rădăcina cu structură primară,

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

țesuturile prezintă o ordonare strict radiară, având o structură extrem de simplă şi constantă (fig. 3); astfel, rizoderma, exoderma, scoarța, endoderma şi periciclul sunt reprezentate de cate un singur strat de celule; acestea înconjoară cilindrul central ce prezintă un număr redus de celule. Endoderma şi scoarța prezintă un număr constant de 8 celule în structura lor (Dolan et al., 1993). Dacă, în trecut, teoria histogenelor a lui Hanstein (1870) prevedea că fiecare set de celule meristematice este „programat" să genereze un anume tip de celule care vor intra în componența unor țesuturi bine definite, astăzi se consideră că informația oferită de poziționarea unei anumite celule în arhitectura apexului radicular este cea care determină evoluția ulterioară a descendentelor ei (Poething, 1987). Această teorie a fost verificată prin experimente de ablație cu laser a unor celule din componența apexului radicular (Van den Berg et al., 1995). După ablație celulele apexului au fost analizate utilizând markeri specifici ai expresiei genelor. Distrugerea celulelor din centrul cuescent, urmată de colapsul total al acestuia, a determinat migrarea pe acest loc a celulelor ce trebuiau să dea naştere inițialelor vasculare. Acestea nu numai că se regăseau pe locul centrului cuescent, dar au manifestat şi caracteristicile acestui tip de celule, evidențiate prin expresia genei columella/cuescent. Distrugerea inițialelor celulelor cortexului a permis inițialelor celulelor din periciclu să se extindă şi pe acest teritoriu, unde au manifestat expresia caracteristică a genelor cortex. Aceste experimente conduc la concluzia că poziția în cadrul meristemului este cea care determină soarta ulterioară a unei celule şi a descendentelor ei, schimbarea precoce a locului unei celule în cadrul

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY



acestei arhitecturi ducând implicit la modificarea expresiei genelor funcționale în corelație cu noua direcție de evoluție.

Fig. 3 – Rădăcina de la *Arabidopsis thaliana*: A – aspectul general al rizodermei trihoblaste și atrihoblaste; B – secțiune transversală prin rădăcină: ep – epiderma, ct – cortex (Schiefelbein et al., 1997).

Alte tipuri de experimente au evidențiat necesitatea continuității unui flux de informații de la celulele mature, diferențiate, la cele meristematice pentru a asigura o dezvoltare normală a acestora. Dacă o celulă situată deasupra unei inițiale a celulelor corticale este distrusă cu laser, întrerupându-se astfel comunicarea între aceasta și celulele deja diferențiate din regiunea superioară a rădăcinii, celula inițială nu se mai dezvoltă normal (Van den Berg et al., 1995).

BCUIAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

I. 2. Adaptarea plantelor la stresul indus de mediu

Stresul indus de factorii de mediu se manifestă sub o gamă largă de forme, una din cele mai comune fiind legată de prezența sau absența apei. Disponibilitatea apei, care acționează în acelaşi timp ca solvent şi mediu de transport, este de multe ori afectată de condițiile efective de mediu. Speciile de plante diferă între ele prin sensibilitatea manifestată la scăderea cantității de apă disponibilă cauzată de secetă, temperaturi scăzute, salinitate crescută, etc. Acestea au capacitați diferite de percepere, semnalare şi răspuns la factorii de stres. De multe ori speciile de plante cultivate au „rude" sălbatice care prezintă capacitați deosebite de rezistență la stres, capacitați care nu se mai regăsesc la cele dintâi. Studiile biochimice au arătat că există numeroase similarități între tipurile de metaboliți acumulați în diverse organisme vegetale (plante vasculare sau talofite – alge sau fungi) ca răspuns la acțiunea factorilor de stres (Potts, 1994). Aceştia sunt reprezentați de compuşi azotați (prolina şi alți aminoacizi, poliamine) compuşi hidroxilici (sucroză, oligozagaride, polialcooli). Acumularea unui anume metabolit nu este restricționată la o singură grupă taxonomică, ceea ce sugerează că adaptările se perpetuează de la grupe ancestrale pe linie evolutivă. Studiile de biologie moleculară au relevat expresia unor grupe de gene similare la numeroase specii de plante foarte diferite filogenetic, atunci când sunt supuse stresului abiotic (Vilardell et al., 1994).

Studiile de genetică şi biologie celulară legate de toleranța plantelor la stres au o importanță deosebită deoarece pot fi aplicate în ingineria

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

genetică pentru a îmbunătăți rezistența plantelor cultivate. Investigarea plantelor supuse stresului furnizează informații legate de plasticitatea căilor metabolice din organismul vegetal, dar şi de limitele acestora (Bohnert et al., 1995). Investigând istoria evolutivă a speciilor ce manifestă o toleranță crescută la stres se pot configura surse importante de gene care, la rândul lor, pot îmbunătăți rezistența altor specii.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

II. Bioindicatorii poluării atmosferice – aplicații și limitări

Determinările fizice și chimice ale poluanților atmosferici reprezintă metode precise prin care se stabilește cantitatea și calitatea acestora și sunt frecvent utilizate în estimarea impactului biologic pe care îl vor avea asupra organismelor vii. Spre deosebire de aceste metode, utilizarea indicatorilor biologici (markeri biologici) conferă date exacte asupra efectului pe care îl are asupra plantelor expunerea la acțiunea diverșilor poluanți. Răspunsul biologic integrează influența directă a poluanților cu modalitățile proprii de răspuns ale fiecărei specii în parte și a fiecărui individ, răspuns care variază funcție de structura genotipului precum și în strânsă corelație cu ceilalți factori de mediu ce acționează asupra organismelor vii. În prezent există un interes tot mai crescut legat de utilizarea markerilor biologici pentru a detecta modificările incipiente ce au loc în structura și funcționalitatea organismelor, înainte ca afectarea ecosistemului să fie majoră. Bioindicatorii pot fi clasificați ca acumulatori ai unui poluant sau ca reactori la acțiunea acestuia.

Când se inițiază un studiu privind impactul poluanților asupra unei anumite specii dintr-un ecosistem trebuie mai întâi stabilit care este statusul curent al acestei specii și care este posibila ei evoluție ulterioară. Această ipoteza cu care se începe studiul presupune că o specie suferă continuu modificări ale statusului ei în ecosistemul din care face parte, schimbări care pot fi spațiale sau temporare.

Metodele de investigare a gradului de poluare într-un ecosistem sunt de două mari categorii: fizico-chimice și biologice.

Metodele fizico-chimice pot descrie cu acuratețe și „în timp real" cantitatea de poluanți dintr-un anume staționar (Guderian et al., 1985).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Aceste metode au o sensibilitate crescută, sunt specifice şi reproductibile, necesitând pentru efectuare *în situ* aparatură performantă, deplasabilă la locul investigațiilor. Este o metodă costisitoare şi de cele mai multe ori necesită personal specializat. Deşi au o mare acuratețe, aceste metode nu presupun luarea în considerare şi a altor factori împreună cu care poluanții acționează sinergic asupra unui organism viu. Metodele fizico-chimice pot stabili doar potențialul impact biologic pe care îl au agenții poluanți într-o anumită zonă, nu şi riscul efectiv pe care îl implică expunerea la acțiunea lor.

Metodele biologice relevă orice răspuns al unui organism sau al unei comunități de organisme atunci când acestea sunt supuse unor factori de stres. Aceste metode pot include atât bioindicatorii (care arată prezența sau absența unui factor de stres), cât şi biomonitorii care furnizează informații suplimentare asupra intensității acțiunii factorilor stresanți (Guderian et al., 1985). Spre deosebire de metodele fizico-chimice metodele biologice nu prezintă aceeaşi precizie în măsurare. Răspunsul biologic nu este influențat numai de durata expunerii şi de concentrația poluantului (poluanților), ci şi de sensibilitatea relativă a fiecărui organism în parte; această sensibilitate este condiționată de vârsta plantei, de condițiile climatice şi edafice în care cresc plantele, de bagajul lor genetic. Avantajul real al utilizării metodelor biologice îl constituie faptul că ele integrează influența diferiților factori (între care şi cei poluanții), iar răspunsul obținut este rezultanta acțiunii acestora şi a reacției organismului viu. De asemenea se poate evalua gradul de risc legat de o anumită expunere. Aceste metode nu sunt foarte costisitoare, iar datele pot fi obținute periodic (lunar, anual).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Comparând metodele disponibile pentru evaluarea riscului legat de poluare putem trage o concluzie simplă: nu există un indicator mai bun pentru investigarea statusului unei specii sau al unui ecosistem decât specia însăşi sau ecosistemul însuşi (Tingey, 1989). Metodele biologice integrează atât rezultatul expunerii la un anume poluant cât şi răspunsul organismului viu; ele au un rol important în determinarea statusului unei specii în ecosistem (atât spațial, cât şi temporal) şi sugerează eventualele măsuri ce pot fi luate pentru ameliorarea stării acestuia.

II. 1. Clasificarea metodelor biologice utilizate în investigarea poluării atmosferice

Metodele biologice pot fi clasificate în pasive şi active. Metodele pasive utilizează plante ce cresc în medii naturale afectate de poluare. Acestea prezintă adaptări ecologice specifice locului în care trăiesc. În cazul studiilor *în situ* este destul de dificil de separat răspunsul fiecărui individ deoarece există, pe de o parte, o neuniformitate a expunerii la un anume agent poluant şi, pe de altă parte, o variabilitate genetică destul de accentuată chiar între indivizii aceleiaşi specii. De asemenea este dificil, de multe ori imposibil, de decelat reacția la un anume poluant, deoarece în mediul natural rareori acționează o sursă unică de poluare care să emită o singura categorie de substanțe. În ciuda acestor limitări, stabilirea gradului de afectare a vegetației într-un anumit ecosistem este în strânsă legătură cu impactul poluării asupra acestuia.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Un organism vegetal poate fi clasificat fie ca reactor la acțiunea unui poluant fie ca un acumulator al acestuia. O specie reactoare manifestă simptome specifice sau un răspuns măsurabil în funcție de intensitatea poluantului; cea mai frecventă reacție de răspuns este afectarea foliară. Pentru a putea fi utilizată ca bioindicator o specie trebuie să prezinte o reacție caracteristică la acțiunea unui anume poluant, care să nu fie confundată cu cea produsă de alți factori de stres.

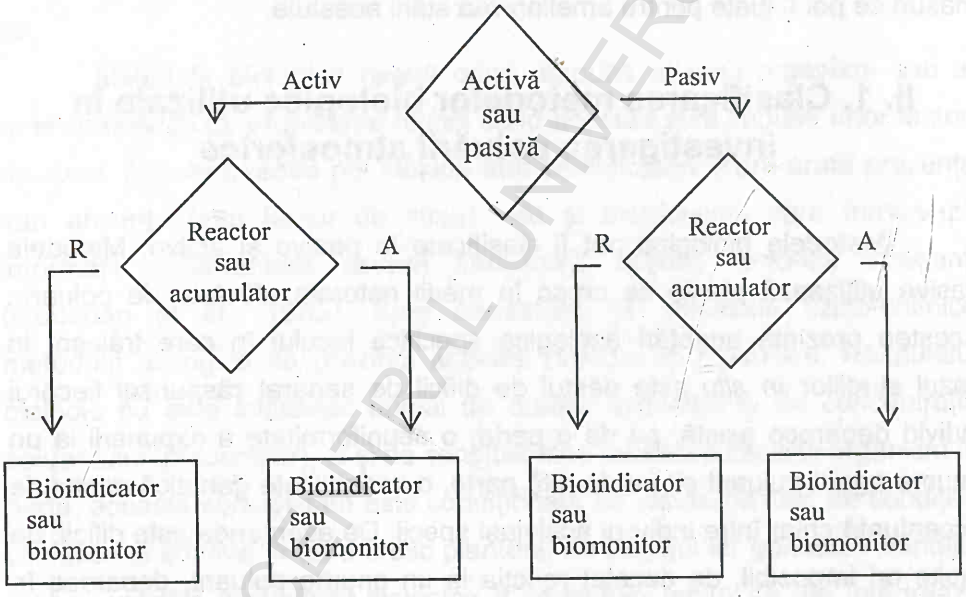


Figura 5 – Clasificarea metodelor biologice utilizate în investigarea poluării atmosferice (Tingey, 1989).

Spre deosebire de un reactor, un acumulator nu este necesar să manifeste anumite simptome, dar trebuie să acumuleze poluantul, prezentând o concentrație mult crescută a acestuia în țesuturi.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Este necesar să se facă o distincție între utilizarea organismelor ca bioindicator sau ca biomonitori. Un bioindicator reprezintă un organism sau un răspuns biologic care relevă prezența unui anume poluant prin apariția unor simptome tipice sau a unor manifestări cuantificabile. Un biomonitor furnizează informații asupra prezentei poluantului și este de așteptat să ofere informații adiționale și asupra efectelor corelate cu intensitatea expunerii la acțiunea acestuia. Bioacumularea unui poluant în țesuturi este considerată un biomonitor. Oricum, este dificil să se realizeze corelații stricte între cantitatea de poluant, remanența în țesuturi, durata și intensitatea expunerii plantei la acțiunea acestuia, deoarece în paralel asupra organismului vegetal acționează și alți factori (edafici, climatici și biologici). În general, plantele expuse la concentrații scăzute de poluanți absorb o cantitate mai mare din aceştia decât cele expuse la concentrații mari care sunt toxice și afectează grav sau chiar omoară diferite părți ale plantei. În timp ce bioindicatorii sunt utilizați de multă vreme și au aplicabilitate cunoscută, biomonitorii încă nu sunt suficient de bine standardizați, pentru a reflecta clar gradul de expunere la un anume poluant.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

II. 2. Bioindicatorii

Sub diferite forme, bioindicatorii au fost utilizați în evaluarea impactului poluării asupra ecosistemelor încă de la începuturile cercetărilor în acest domeniu. În ultima perioada interesul față de aceştia a crescut în paralel cu încercările de soluționare a problemelor de mediu. Față de metodele fizico - chimice, bioindicatorii au avantajul că oferă date concrete privind gradul de afectare a organismelor vii. O gamă variată de posibile răspunsuri ale plantelor pot fi utilizate ca bioindicatori (tabelul 1).

Biomasa plantei	Analiza chimică a țesuturilor
Răspunsul morfologic şi structural	Concentrația poluanților în
Simptomatologia foliară	țesuturi
Modificări histologice	Metaboliții secundari
Modificări ultrastructurale	Regimul hidric al plantei
Răspunsul fiziologic	Transpirația
Fotosinteza	Permeabilitatea membranară
Respirația	Activitatea enzimatică
	Pigmenții

Tabelul 1 – Exemple de posibile modalități de răspuns al plantelor la stres (modificat după Tingey, 1989).

În procesul de selecție a bioindicatorilor trebuie să se țină seama de câțiva parametri (Tingey, 1989):

- să fie uşor de măsurat şi să descrie răspunsuri în corelație cu starea ecosistemului;

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

- să manifeste un răspuns specific, capabil să previzioneze cum anume specia reacționează la stres;
- măsurarea răspunsului să fie suficient de precisă;
- să se bazeze pe cunoaşterea agentului poluant şi a caracteristicilor sale;
- să poată fi utilizați în interpretarea gradului de afectare al ecosistemului, furnizând date definitive despre starea acestuia.

Utilizarea bioindicatorilor serveşte, de multe ori, la rezolvarea unor probleme legate de un interes concret al cercetătorilor. De exemplu, este foarte importantă cunoaşterea influenței poluării asupra biomasei forestiere având în vedere interesul economic pe care îl prezintă pădurile. Dar măsurarea exactă a biomasei este complicată, costisitoare şi necesită un timp îndelungat. Astfel, estimarea trendului general al biomasei se face utilizând metode alternative, cum ar fi determinarea cantității de amidon din frunzele de vară, a duratei de viață a frunzelor etc. Astfel, informațiile privind starea ecosistemului se pot obține rapid şi cu costuri reduse. Trebuie însă demonstrat că aceste metode au suficientă acuratețe încât să înlocuiască procesul de determinare efectivă a productivității.

II. 2. 1. Exemple de bioindicatori şi limitele utilizării lor în diagnosticarea ecosistemelor

Ideea speciilor bioindicatoare este vehiculată încă din secolul trecut, când a fost observată capacitatea indicatoare a lichenilor în ceea ce priveşte compoziția, puritatea şi umiditatea aerului. În a doua jumătate a secolului XX, cercetările au vizat în general găsirea unor indicatori şi

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

punerea la punct de metode care să ofere informații legate de poluanți (ai aerului, solului, apelor). Ulterior, pe măsura apariției preocupărilor legate de alte tipuri de degradare a ecosistemelor, s-a căutat identificarea unor bioindicatori care să ofere informații legate de stabilitatea ecosistemelor, de menținerea biodiversității, de gestionarea durabilă a unor ecosisteme forestiere sau agricole (efectul anumitor măsuri sau tehnici de gestionare asupra acestor ecosisteme), sau informații legate de răspunsul ecosistemelor la modificarea globală a climei.

În ceea ce priveşte indicatorii poluării, aceştia sunt de două tipuri: specii sensibile, care indică prezența unui poluant prin apariția unor leziuni sau malformații, şi specii acumulatoare, care concentrează poluantul în corpul lor. Mai există şi o altă categorie, şi anume specii care proliferează şi devin abundente în zonele poluate. Indicatorii poluării sunt animali sau vegetali, aceştia din urmă fiind mai numeroşi. Bioindicatorii pentru poluare au ca avantaj, față de monitorizarea instrumentală, faptul că pot oferi un răspuns la efectul combinat al anumitor poluanți, spre deosebire de instrumente, care măsoară separat cantitățile fiecărui poluant şi pot da indicații, în urma analizei de țesuturi, legate de cantități foarte mici de poluanți din mediu, precum şi de evoluția poluantului în timp, pe perioade mai îndelungate (Măciuca, 2003).

Aşa cum s-a menționat, primele şi cele mai cunoscute specii folosite ca indicatoare ale calității aerului au fost lichenii. Valoarea lor ca bioindicatori a fost recunoscută încă de acum 100 de ani, dar metode concrete de monitorizare a poluării aerului cu dioxid de sulf, prin intermediul lichenilor, au fost puse la punct şi îmbunătățite în ultimii 30 de ani.

BCU ASE CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Alte specii de plante au fost utilizate ca indicatori ai poluării cu ozon; aceşti bioindicatori (împreună cu alți indicatori ai poluării aerului) pot fi încadrați în două categorii: specii introduse, în general plante ierboase, repede-crescătoare, uniforme genetic, numite generic "specii santinelă" (utilizarea lor face obiectul metodelor active de biomonitorizare) şi specii care cresc natural într-o anumită zonă, sunt plante perene, arbuşti sau arbori, cu creştere înceată şi care au o reacție lentă la creşterea concentrației de poluant, efectele apărând mai târziu în decursul perioadei de vegetație; aceste specii sunt numite generic "specii detector" sau biomonitori (utilizarea lor face obiectul metodelor pasive de monitorizare).

Exemple pentru speciile din prima categorie sunt tutunul (*Nicotiana tabacum* L.) şi urzicuța (*Urtica urens* L.), iar pentru speciile din a doua categorie, în S.U.A. se utilizează: mălinul american (*Prunus serotina* Ehrh.), pinul galben (*Pinus ponderosa* Laws.), frasinul american (Fraxinus *americana* L.), frasinul de Penssylvania (*Fraxinus pennsylvanica* Marsh.), plopul temurător (*Populus tremuloides* L.), arborele lalea (*Liriodendron tulipifera* L.).

Speciile-santinelă reacționează de obicei rapid la creşterea concentrației de ozon din aer, fiind folosite pentru a semnala de timpuriu prezența acestuia. Reacția rapidă este însă caracteristică doar stadiilor juvenile şi de aceea plantele trebuie reintroduse periodic. Ele sunt în prealabil cultivate în aer curat, lipsit de poluanți şi transplantate apoi în zonele monitorizate; fiind uniforme genetic, reacția lor la poluant este relativ uniformă.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Speciile-detector nu fac obiectul unor măsuri speciale de îngrijire în mediul natural în care cresc. Trebuie menționat că doar unii indivizi dintr-o populație, şi anume cei sensibili, reacționează la concentrații ridicate de ozon. De asemenea, reacția indivizilor este condiționată şi de celelalte condiții staționale.

Printre alte specii de plante care sunt utilizate ca bioindicatori pentru diferiți poluanți se pot menționa: sunătoarea (*Hypericum perforatum* L.) pentru acid fluorhidric, urzicuța (*Urtica urens* L.) pentru ozon şi pentru peroxiacetil-nitrați, zâzania (*Lolium multiflorum* Lam.) pentru acid fluorhidric şi metale grele, fetica (*Valerianella locusta* Betke.) pentru metale grele, lucerna (*Medicago sativa* L.) pentru dioxidul de sulf, orzul (*Hordeum vulgare* L.) pentru metale grele şi compuşi ai florului, porumbul (*Zea mays* L.) pentru acid fluorhidric, dioxid de sulf, metale grele etc (Măciuca, 2003).

Modificările în simptomatologia foliară sunt probabil cei mai utilizați bioindicatori pentru stabilirea stării de sănătate a unui ecosistem, în special a celor forestiere. Există numeroase lucrări ştiințifice care au ca subiect modificări la nivelul aparatului foliar induse de poluanți atmosferici (Jacobson şi Hill, van Haut şi Strattman, 1970, Manning şi Feder, 1980). Prezența sau absența modificărilor la nivel foliar au fost utilizate pentru a identifica zonele de impact, în timp ce tipurile de modificări observate au reprezentat indicii asupra acțiunii unui anume factor poluant.

În cazul ozonului manifestările foliare erau considerate suficient de specifice pentru ca simpla lor prezență să indice existența poluării, ele nefiind induse de un alt tip de agent poluant sau de alți factori de stres. Însă cercetările de expunere controlată au arătat că o mixtură de ozon şi dioxid de sulf produce afectări foliare asemănătoare şi imposibil de distins de cele

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

induse numai de ozon (Tingey et al., 1973). Se manifestă deci un fel de mimetism simptomatic (manifestările determinate de un factor poluant sau de alți factori de stres pot fi deseori confundate cu acțiunea altui factor poluant). O altă limitare a utilizării simptomatologiei foliare pentru identificarea poluanților care apar în anumite zone este dată de imposibilitatea expunerii tuturor speciilor de plante la toți poluanții cunoscuți pentru a înregistra modalitățile lor de răspuns la acțiunea acestora. Interpretarea simptomatologiei foliare necesită o experiență destul de vastă pentru ca potențialii factori poluanți să fie corect stabiliți. Datele obținute în acest fel trebuie completate cu informațiile deja existente în literatura de specialitate privind particularitățile de reacție a diferitelor specii (în funcție de genotip, de condițiile de mediu etc.) precum și cu informații privind compoziția atmosferică la un moment dat în regiunea investigată.

Concentrațiile crescute de poluanți în țesuturile vegetale au fost frecvent utilizate pentru a stabili acțiunea și intensitatea poluării în anumite zone (Arndt et al., 1987). Când astfel de analize chimice sunt efectuate, este necesar să existe un minim de informații despre potențialii agenți poluanți din zonă și despre sursele acestora. Acest tip de investigații este costisitor, necesită o cantitate mare de material vegetal și numeroase tipuri de extracte și tehnici analitice pentru a depista cantitățile crescute dintr-un anume element care ulterior să poată fi considerat agent poluant. În urma analizelor poate fi identificat un singur element sau mai multe elemente (sau compuși) susceptibili de a produce dereglări metabolice sau structurale la nivelul aparatului foliar. Dacă sursa suspectă de prezența poluării în zona este cunoscută, devine mult mai ușor de aflat dacă un

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

anume component este prezent într-o concentrație mai mare decât cea normală într-un țesut vegetal; astfel poate fi stabilit designul unui experiment prin care este prelevat un număr optim de probe necesare investigațiilor. Odată stabilită distribuția agentului poluant în zona luată în studiu, alte tipuri de răspuns al plantelor (cum ar fi creşterea concentrației peroxidazelor) pot fi interpretate ca efecte ale toxicității acestuia asupra organismului vegetal. Concentrațiile de poluanți din țesuturile plantelor variază destul de mult funcție de diverşi factori cum ar fi: poziția țesutului în plantă, expunerea acestuia la agentul poluant, vârsta plantei, condițiile de mediu, vigoarea individului expus etc.

În general, utilizarea bioindicatorilor oferă mai mult date despre starea de afectare a ecosistemului, despre intensitatea acestei afectări şi mai puțin despre sursa dezechilibrului. Pentru a obține un tablou cât mai complet, se recomandă utilizarea unor metode combinate.

II. 3. Markerii biologici ai stresului şi relația cauză-efect

Efectele poluării atmosferice asupra organismelor vegetale şi animale au constituit de mult timp unul din subiectele de cercetare frecvent abordate de numeroşi autori. Chiar dacă organismele investigate trăiesc la o oarecare distanță de sursa efectivă de poluare, creşterea concentrației atmosferice a unor substanțe chimice este capabilă să provoace efecte vizibile atât din punct de vedere metabolic şi fiziologic, cât şi din punct de vedere structural şi ultrastructural. Acestea scad rezistența individuală la boli, dăunători precum şi la stresul abiotic, ducând în cele din urmă la

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

moartea unor indivizi (Kozlowski, 1985, McBride, 1985). Cei mai întâlniți poluanți atmosferici susceptibili de a produce efecte negative asupra vegetației sunt acidul sulfuric și oxizii de sulf, acidul nitric și oxizii de azot, ozonul.

Aplicațiile markerilor biologici ai poluării atmosferice în diverse ecosisteme sunt legate de două abordări majore: investigații asupra modificărilor ce apar la speciile vegetale expuse poluanților (ceea ce generează un nivel crescut de stres abiotic) și demonstrarea, prin experimente controlate, dacă un anume poluant produce un răspuns măsurabil la nivel chimic sau structural.

Procesele biologice depind fundamental de o variabilă deseori neglijată sau luată prea puțin în considerare – timpul. Acestea sunt puternic influențate de variațiile zilnice sau sezoniere, precum și de modificările din ecosisteme ce au loc anual sau în perioade mai lungi de timp.

Factorul timp este, de asemenea, important în selectarea biomarkerilor implicați în evaluarea procesului cronic, dar cu nivel redus de poluare, care se manifestă în luni sau ani. De exemplu, modificarea ratei fotosintezei reprezintă un marker util pentru a evalua expunerile pe termen scurt la poluanți gazoși de concentrație mare, dar devine prea puțin folositoare dacă e vorba de un caz de poluare cronică; în acest caz, o semnificație crescută o au modificările ce afectează rezervele de carbohidrați sau pierderea integrității membranelor celulare. Un marker biologic ideal trebuie să fie ușor măsurabil (cuantificabil), să răspundă specific la un anume poluant, să indice simptome distinctive care să nu se confunde cu cele cauzate de alți factori de stres.

BCU ARAD / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

II. 3. 1. Stabilirea relației cauză-efect

Una din problemele majore în alegerea şi utilizarea unor markeri biologici este legată şi de detectarea timpurie a influenței poluanților şi stabilirea cât mai precisă a relației cauză-efect. Investigațiile nu au totdeauna rezultate satisfăcătoare, însă această abordare este foarte importantă pentru înțelegerea consecințelor expunerii la poluanți şi apoi a controlului acestui fenomen.

Pentru ca markerii biologici să fie acceptați ca indicatori ai stresului indus de poluare trebuie demonstrată legătura ce există între cauză (poluant) şi răspuns (modificarea măsurată de marker). Pentru evaluarea utilității diferiților markeri biologici se iau în considerare anumite criterii fundamentale pentru stabilirea complexului relațional cauză-efect.

Smith (1981) a clasificat interacțiunile dintre poluanții atmosferici şi ecosistemele forestiere în trei clase: când concentrația poluanților atmosferici este scăzută vegetația este puțin sau deloc afectată (clasa I). O concentrație moderată a acestora duce la afectarea sesizabilă a organismelor vegetale (clasa II), iar în cazul concentrațiilor crescute de poluanți efectele asupra ecosistemului sunt acute, deseori asociate cu morbiditate sau chiar mortalitate (clasa III).

Stresul cronic poate induce o serie de modificări atât la nivel individual (în unele cazuri soldându-se chiar cu creşterea rezistenței la poluare), cât şi la nivelul succesiunii de asociații vegetale, acestea din urmă fiind mai bine cunoscute. Evaluarea experimentală a influenței unor poluanți asupra organismelor vegetale nu este de cele mai multe ori uşor de făcut. În natură nu se poate izola un singur poluant astfel încât să fie

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

evaluată strict acțiunea acestuia asupra structurii şi funcțiilor plantei. De regulă, acestea sunt supuse acțiunii mai multor poluanți cât şi a altor surse de stres, deci răspunsul lor va fi unul conjugat şi nu unul specific.

În definirea cât mai clară a relației cauza-efect trebuie să se țină cont de câteva principii:

- corelația puternică între efectul măsurat şi cauza presupusă a acestui efect;
- mecanismul de producere a efectului este plauzibil dacă luăm în considerație cauza? Există o explicație biologică, coerentă a acestuia?;
- reproductivitatea efectului în condiții experimentale. Efectul trebuie să poată fi obținut experimental, în momentul în care agentul presupus cauzal determină acelaşi efect asupra organismului vegetal. De asemenea, efectul trebuie să apară în „gradient biologic", adică cu cât cauza este mai intensă, şi efectul urmează aceeaşi tendință;
- temporalitatea – o cauză întotdeauna precede un efect sau este prezentă pe tot parcursul observării acestuia.

Însă în condiții normale de mediu aceste criterii sunt greu de îndeplinit, deoarece intervin numeroşi factori de interferență. Un anume marker poate fi suficient de specific încât să indice o disfuncționalitate a sistemului, dar nu suficient de particularizat încât să susțină o puternică relație cauză-efect.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

De aceea trebuie să se facă o distincție clară între markerii generali, integrativi din punct de vedere biologic, ai influenței stresului asupra organismelor vegetale şi markerii specifici pentru anumiți agenți poluanți, care pot distinge clar cauzele potențiale ce duc la apariția unui anume efect.

II. 3. 2. Utilizarea markerilor biologici în studiile experimentale

Există mai multe tipuri de investigații ce se pot efectua în cadrul studiilor legate de influența poluanților asupra organismelor vegetale:

- evaluarea gradului de afectare a vegetației din anumite zone corelată cu măsurători efectuate asupra cantității diverşilor agenți poluanți ce se regăsesc în aceste perimetre;
- efectuarea unor experimente în cadrul cărora să se determine corelațiile dintre doza utilizată şi intensitatea răspunsului obținut;
- efectuarea de experimente care să determine mecanismele biologice ce leagă efectele observate de agenții poluării atmosferice.

Singură, nici una dintre aceste abordări nu este suficientă pentru a stabili relația cauză-efect dintre poluare şi răspunsul integrativ pe care organismele vii îl au față de aceasta.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

II. 3. 3. Evaluarea gradului de afectare a vegetației

Aceasta aduce informații legate de numărul indivizilor și al speciilor ce prezintă manifestări vizibile ale suferinței produse de prezența poluanților atmosferici, cum ar fi scăderea ratei de creștere, mortalitatea, afectarea structurii și funcționalității aparatului vegetativ sau de reproducere. Supravegherea adecvată și atentă a stării comunităților vegetale poate furniza informații importante legate de corelația între posibilii agenți cauzali și efectul observat la nivelul acestora.

Dacă se observă o corelație spațială sau temporară (în gradient) între concentrația poluanților incriminați și intensitatea răspunsului observat în comunitățile vegetale, relația cauză-efect poate fi astfel argumentată. Cauzalitatea este, de asemenea, susținută și de prezența unui poluant atmosferic (sau a altor factori de stres) imediat înainte sau în timpul observării unor disfuncționalități structurale sau funcționale ale comunității sau indivizilor observați. Deoarece impactul antropic asupra mediului este multicauzal, fiind determinat de o multitudine de agenți, sunt rare situațiile când, prin observații asupra ecosistemelor, se poate stabili o corelație strictă între o disfuncție și o singură cauză ce o provoacă.

Acest tip de observații sunt strict corelative și pot fi ușor distorsionate dacă factorul presupus cauzal nu este corect măsurat și nu este plasat într-o perspectivă temporală.

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

II. 3. 4. Studiile de expunere controlată

Acest tip de teste au rolul de a compara efectele observate la plantele sănătoase care sunt expuse acțiunii unui anume agent poluant şi efectele observate în cadrul populațiilor naturale în care se presupune că acționează şi acel agent poluant, singur sau în corelație cu alți factori de stres. Există şi experimente în cadrul cărora plantele sunt expuse unui complex de factori cu efect stresant, în cantități şi pe perioade strict determinate.

Pentru efectuarea acestor teste se utilizează camere de creştere sau sere, în cazul plantulelor, plantelor tinere sau a plantelor ierboase de dimensiuni mici. În cazul arborilor maturi se practică izolarea unor ramuri care sunt expuse controlat acțiunii unui agent poluant, într-o singură doză sau în mai multe, funcție de structura experimentului. Rezultatele sunt măsurate şi corelate cu intensitatea agentului (sau agenților) poluanți care au acționat asupra plantelor sau a diferitelor organe, precum şi cu timpul de expunere aplicat în fiecare caz în parte. Rezultatele acestor teste se exprimă deseori prin curbe doză-răspuns din care se poate deduce concentrația minimă aplicată pentru a obține o modificare sau a induce simptomele aşteptate la nivelul indivizilor aflați în studiu.

Pentru a fi îndeplinit criteriul corelației graduale a cauzei cu efectul, este necesar să existe o relație cantitativă între concentrația agentului poluant şi intensitatea disfuncțiilor observate la nivelul indivizilor studiați. Curba doză-răspuns se dovedeşte uneori greu de interpretat, deoarece răspunsul plantelor la acțiunea diverşilor factori poluanți poate fi influențat de factorii de mediu, biotici sau abiotici, inclusiv unii factori de stres.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Experimentele de expunere controlată pot fi utilizate și pentru a investiga corelațiile dintre acțiunea poluanților atmosferici și alte forme de stres. Cu cât există mai multe diferențe între rezultatele acestor experimente și observațiile efectuate asupra populațiilor naturale expuse agenților poluanți, cu atât este mai dificilă extrapolarea rezultatelor din laborator asupra evenimentelor ce se petrec în mediul natural.

Cei mai mulți markeri biologici care sunt indicați pentru a fi utilizați în evaluarea impactului poluării asupra organismelor vegetale manifestă același tip de răspuns atât în condiții naturale, cât și în condițiile experimentelor controlate. O serie de markeri biologici adiționali ce sunt utilizați în aceste studii sunt prezența plantelor indicatoare (cum ar fi unele specii de licheni) sau a unor metaboliți secundari.

II. 3. 5. Experimentele pentru determinarea mecanismelor relației cauză-efect

În stabilirea unei relații tip cauză-efect, este important să se determine cum anume o disfuncție sau o modificare structurală observată este rezultatul acțiunii unui anume factor, printr-un proces fizic sau biologic. Experimentele de acest gen sunt cu atât mai valoroase, cu cât acțiunea mecanismului de producere a relației cauză-efect poate fi demonstrat atât în mediul natural, cât și în mediul artificial al experimentelor controlate. Pentru elucidarea mecanismului de intervenție al factorilor stresanți se utilizează mai cu seamă investigațiile la nivel tisular, celular și subcelular, din punct de vedere structural, fiziologic și biochimic. Pentru a avea o

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

imagine cât mai clară a acțiunii agenților poluanți asupra organismului ca întreg trebuie luate în considerație atât modificările structurale şi ultrastructurale, cât şi cele biochimice, ale diferitelor căi metabolice care reflectă reacția plantei la stres, referitoare atât la compensațiile, cât şi la disfuncțiile ce intervin la acest nivel.

II. 3. 6. Strategii de utilizare a biomarkerilor în evaluarea gradului de stres din ecosisteme

O strategie eficientă de utilizare a markerilor biologici pentru evaluarea gradului de afectare a ecosistemelor supuse la stres trebuie să implice clasificarea acestora în grupe funcționale şi utilizarea lor într-o formulă sistematică de diagnostic.

Ecosistemele naturale necesită utilizarea unor markeri biologici care, folosiți corespunzător, să permită evaluarea impactului pe care factorii de stres îl au asupra structurii şi funcționalității lor. Dintre aceşti factori, poluanții atmosferici sunt cei a căror acțiune poate fi relativ uşor înlăturată de om, prin utilizarea unui management adecvat. Simpla utilizare a markerilor biologici în ecosistemele afectate ne poate furniza informații utile asupra strategiilor de mediu ce pot fi aplicate în acele zone în vederea îmbunătățirii sau măcar a ameliorării situației din zona respectivă.

Serii de markeri biologici pot fi realizate cu scopul de a uşura detectarea efectelor specifice ale acțiunii poluanților atmosferici asupra plantelor.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Este necesară clasificarea markerilor biologici pe categorii care să poată fi utilizate pentru identificarea zonelor afectate de poluarea atmosferică și în care speciile vegetale au de suferit de pe urma acesteia.

1. *Markeri biologici de răspuns la schimbările de mediu* – răspunsul plantelor la schimbarea factorilor de mediu este continuu, iar acesta implică utilizarea unor serii de markeri cum ar fi: schimbările în fluxul nutrienților din ecosistem, ratele anormale ale fotosintezei sau a altor procese metabolice, conținutul de clorofilă, metaboliții secundari, micromorfologia cuticulară etc.
2. *Markeri biologici de compensare a stresului* - o modalitate foarte utilă de evaluare a importanței stresului indus de factorii de mediu asupra organismelor vegetale este determinarea gradului în care acestea dezvoltă mecanisme compensatoare care să limiteze efectele negative. Compensarea poate neutraliza - în primele stadii - sau limita ulterior impactul stresului, prin maximizarea productivității și prin creșterea ratei de supraviețuire. De asemenea, pot avea valoare de diagnostic mecanismele de compensare; ele sunt caracteristice unui mod particular de stres indus de diverși factori de mediu. Compensarea la plante ca răspuns la stresul indus de factorii de mediu poate avea loc la nivel biochimic, fiziologic, morfologic, structural sau chiar la nivelul ecosistemului. De exemplu, arborii pot compensa efectul secetei prin închiderea stomatelor și prezervarea apei în corpul lor, precum și prin extinderea sistemului radicular, ceea ce duce la mărirea cantității de sol explorate în căutarea acestei resurse

BCU IAȘI / UAIC IAȘI UNIVERSITY LIBRARY

vitale. Aceste forme de compensare diferă clar de o simplă reacție a unor plante la stres; acestea îşi măresc accesibilitatea la o resursă ce le este dramatic limitată. Creşterea, supraviețuirea şi chiar fenotipul plantelor care realizează compensarea sunt afectate negativ comparativ cu cele manifestate de plantele nesupuse la stres, dar au nivele mai convenabile față de plantele stresate, dar care nu realizează compensarea. Dacă se realizează descrierea procesului de compensare ca urmare a acțiunii unor factori poluanți, iar markerii specifici pentru aceasta sunt definiți, atunci este posibilă identificarea în teren a acelor organisme capabile să realizeze compensarea şi diferențierea lor de indivizii aceleiaşi specii care nu manifestă acest mecanism de protecție.

3. *Markerii biologici ai toxicității* – efectul toxic al poluanților atmosferici față de organismele vegetale apare atunci când cantitatea de poluant preluată de plantă depăşeşte capacitatea ei de compensare. În acest caz, planta este incapabilă să-şi păstreze starea de sănătate la parametri optimi. Există o serie de markeri care să indice astfel de fenomene cum ar fi: pierderea integrității membranare, conținutul ridicat de poluanți din țesuturi, modificări histologice la nivelul frunzei, afectarea țesutului conducător liberian etc. Poluanții atmosferici, ca şi alți factori de stres, pot induce modificări grave la nivel celular, care culminează cu moartea celulară. Ei pot, de asemenea, să afecteze membranele celulare, lipsindu-le de selectivitatea ce împiedică intrarea agenților poluanți în protoplast şi permițând astfel

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

acumularea lor în cantități mari la nivelul diverselor țesuturi. Modificările pot fi localizate sau extinse, caz în care celulele moarte sau ireversibil afectate devin vizibile macroscopic, iar individul vegetal este compromis. Se cunosc astfel manifestările sub forma clorozelor sau necrozelor ce apar pe frunze ca urmare a acțiunii poluanților gazoși de tipul ozonului, oxizilor de sulf sau de azot. Aceste simptome vizibile pot fi specifice pentru un anume poluant, dar se pot manifesta și ca urmare a acțiunii altor factori de stres, diferiți de aceștia. Pierderea frunzelor sau afectarea suprafețelor foliare ca urmare a efectului toxic al poluanților atmosferici pot apărea și ca urmare a altor fenomene în afară de moartea celulară. Este cunoscut faptul că poluanții gazoși grăbesc fenomenele de senescență celulară atât la speciile de plante lemnoase cu frunze căzătoare, cât și la cele cu frunze sempervirente. Absorbția poluanților gazoși (cum ar fi ozonul sau dioxidul de sulf) la nivel foliar poate duce la modificarea căilor metabolismului secundar, având ca efect producerea și acumularea în celule a răşinilor și polifenolilor; aceștia duc nu numai la moartea celulelor în care sunt localizați ci afectează și grupele de celule învecinate. Ele prezintă frecvent zone cu pereți îngroșați și depuneri brune în interiorul protoplastului, uneori chiar și în pereții celulari. Decolorarea limbului foliar și apariția petelor necrotice poate fi o consecință a poluării atmosferice, dar poate fi cauzată și de alți factori (de exemplu carențe de microelemente). De aceea este utilă folosirea

BCU IAȘI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

unor serii de markeri biologici în diagnosticul stării de sănătate a unui ecosistem, pentru a stabili dacă afectarea este dată de poluare sau de alți factori de stres. Asocierea se poate face cu determinarea cantității de metale grele sau a compuşilor sulfului din țesuturile vegetale care sunt vizibil modificate în cazul expunerii plantelor la diverse categorii de poluanți.

Aceste trei tipuri de markeri biologici - ai răspunsului la factorii de stres din mediu, ai compensării şi ai toxicității – trebuie utilizați într-o manieră sistematică pentru a elucida modificările induse de poluanți la nivelul indivizilor sau a grupărilor de indivizi. Pentru orice investigație de această natură este necesară o evaluare preliminară a calității aerului din zonă şi stabilirea unui complex de markeri ce trebuie urmăriți pentru a realiza o monitorizare adecvată. Aceasta poate releva nu numai configurația interacțiunii dintre ecosistem şi diverşi factori poluanți, ci poate contribui şi la identificarea altor surse de stres la nivelul comunităților investigate.

Dacă markerii de răspuns la modificările de mediu sugerează existența poluării atmosferice într-o zonă dată, pot fi efectuate în continuare teste pentru evaluarea markerilor compensării şi ai toxicității în ecosistem. Deoarece compensarea şi intoxicarea acută se produc în timp, detectarea prezenței lor cu ajutorul markerilor biologici semnifică o acțiune îndelungată a factorilor poluanți în zonă. Ca rezultat al acțiunii acestora este posibilă o scădere a capacității de compensare şi la alți factori de stres şi, în consecință, scăderea ratei de creştere, a productivității şi a capacității de reproducere. De asemenea, detectarea markerilor compensării justifică

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

continuarea investigațiilor cu markerii toxicității și ai absorbției poluanților; în acest fel afectările vizibile la nivelul aparatului foliar pot fi interpretate cu o mai mare acuratețe.

Utilizați individual, markerii biologici cunoscuți până în prezent sunt insuficienți pentru a crea un tablou complex al declinului ce apare în unele ecosisteme ca urmare impactului antropic, tot mai puternic în ultimul timp. Însă dacă se utilizează complexe selectate de biomarkeri în funcție de particularitățile fiecărui caz investigat, este posibilă realizarea unei diagnoze destul de apropiate de realitate.

Deocamdată nu există un singur marker biologic prin a cărui analiză să se poată decela cu certitudine efectele poluării atmosferice asupra unui organism vegetal. Alți factori de stres pot induce la un moment dat manifestări similare la nivel individual; aceştia pot fi reprezentați de secetă, carențe de azot, agenți patogeni sau atacul diferitelor specii de insecte. Pe de altă parte, un singur agent poluant poate induce o varietate de reacții la nivel structural, ultrastructural, fiziologic şi biochimic. De exemplu, ozonul determină cloroze, necroze, arsuri, precum şi o reducere a ratei de creştere.

Există diferențe între specii, precum şi între indivizii aceleiaşi specii, în ceea ce priveşte capacitatea genetică de a prelua, absorbi, asimila şi elabora reacții de răspuns la diverşi poluanți atmosferici. De aceea speciile şi indivizii prezintă sensibilități diferite la acțiunea acestora din urmă. Relația cauză-efect legată de expunerea indivizilor la poluare poate varia destul de mult chiar în interiorul speciei, ceea ce adaugă un plus de complexitate investigațiilor ce privesc markerii biologici. Diferențele de sensibilitate între diverse specii pot fi exploatate prin axarea investigațiilor

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

pe speciile cele mai sensibile la poluare. De exemplu, lichenii sunt cunoscuți ca fiind extrem de sensibili la poluarea cu dioxid de sulf. Unele specii de pin şi tutunul manifestă o sensibilitate crescută la poluarea cu ozon. Efectul poluanților poate varia şi în interiorul speciei, de la individ la individ, funcție de genotipul acestuia, de simbiozele pe care le realizează, de vârsta plantei etc.

Factorii de mediu ce măresc rata de transfer a gazelor la nivelul stomatelor determină automat o preluare a unei cantități crescute de poluanți şi un efect mai intens asupra plantei. Diferențele de genotip care există între populații aparținând aceleiaşi specii determină apariția unor reacții fiziologice la stres diferite ce conferă sensibilități diferite acestor populații. Aceste variații cu substrat genetic sunt binecunoscute la pinul alb şi la plop, specii în cadrul cărora sensibilitatea la stres diferă mult de la o populație la alta. În completare, microorganismele simbiotice care se găsesc la nivelul rizosferei şi al filosferei pot determina modificări în gradul de sensibilitate al unor indivizi.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

III. Suprafața foliară – biomonitor în poluarea atmosferică cu pulberi

La cele mai multe specii vegetale stomatele sunt localizate la nivelul epidermei inferioare. Ansamblul stomatelor unei frunze funcționează similar cu un filtru, gazele fiind trecute prin acesta, iar particulele depunându-se la suprafața filtrului. Datorită unei asemenea configurații, particulele depuse pe epiderma superioară a frunzelor sunt întotdeauna mai mari decât cele depuse la nivelul epidermei inferioare (la frunzele hipostomatice). Deoarece fluxul de aer la nivelul ostiolei stomatelor este destul de redus, doar particulele de dimensiuni foarte mici vor fi reținute la acest nivel. Particulele de pe epiderma superioară sunt, de regulă, particule mari de praf, fapt dovedit şi de studiile de microscopie electronică cu baleiaj, legate de suprafețele foliare, efectuate la diverse specii de plante. Deoarece aceste particule de pe suprafețele foliare provin din aer, analiza lor furnizează informații despre intensitatea poluării atmosferice cu pulberi în zona investigată.

În zonele urbane se observă concentrații mai mari de microparticule în aer datorită activităților umane şi industriale intense şi numărului crescut de autovehicule. În comparație cu acestea, în zonele rurale cantitățile de pulberi din aer sunt mai reduse. Investigațiile efectuate asupra epidermei frunzei provenind de la specii de plante ce cresc în zona urbană, suburbană şi rurală arată o scădere a concentrației de microparticule (Coe, 1987, Abraham, 1998, Johnson et al., 1999). Frunzele diferitelor specii de plante prezintă particularități distincte ale suprafețelor lor foliare. Unele frunze, care au rugozități la nivelul cuticulei ce acoperă celulele epidermice, au o capacitate mult mai mare de a stoca particulele solide din aer

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

(deoarece acestea aderă la suprafața foliară) față de frunzele cu o cuticulă fină sau chiar lucioasă.

Investigațiile realizate de Johnson şi colaboratori (1999) au arătat o variație foarte mare a concentrației particulelor de pe frunzele din zone intens poluate şi din zone slab poluate; densitatea acestora a variat de la 55,3/mm^2 la 4166,7/mm^2 (fig. 5).

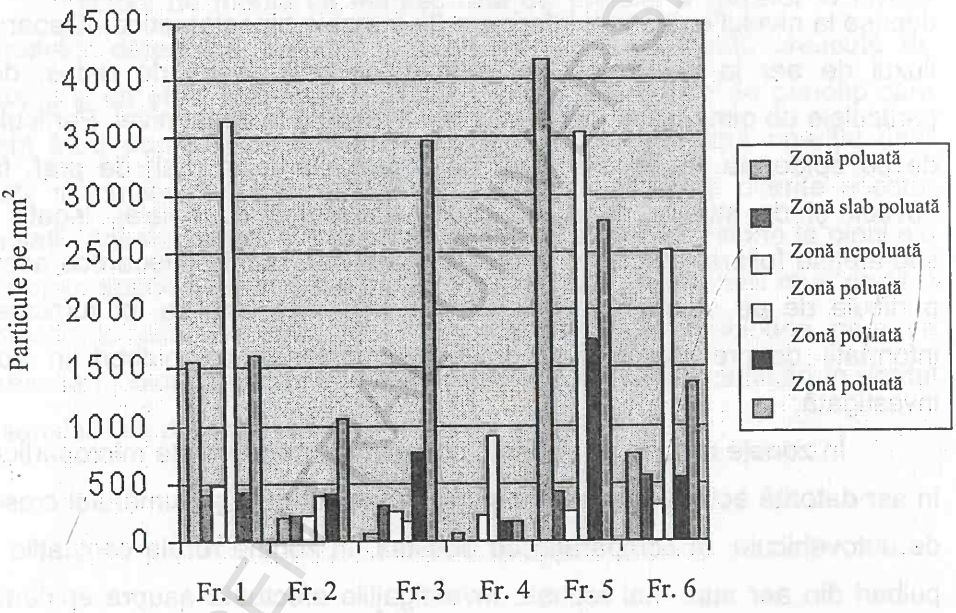


Fig 5 - Analiza comparativă a concentrației particulelor de pe suprafețele foliare de la plante din zone cu grade diferite de poluare (Johnson et al.,1999).

Determinările s-au realizat utilizând frunze de la diverse specii de plante lemnoase: *Gleditschia triacanthos, Cephalanthus occidentalis, Celtis occidentalis, Fraxinus americana, Tilia americana.*

Distribuția particulelor pe cele două epiderme ale frunzei prezintă, de asemenea, mari variații. Concentrațiile crescute ale particulelor se regăsesc pe epiderma superioară (şi sunt date în special de depunerile sub formă de praf), cele de pe epiderma inferioară fiind mai reduse şi datorate în special fluxului de aer ce circulă la nivelul ostiolei stomatelor (fig. 6).

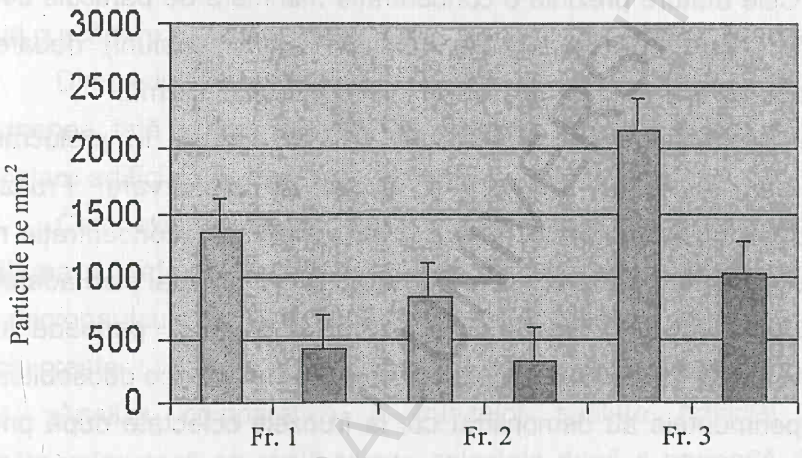


Fig. 6 – Distribuția particulelor solide pe epiderma superioară şi pe cea inferioară a frunzelor din zone cu grade diferite de poluare (Johnson et al.,1999).

De asemenea, variații importante se înregistrează şi în cazul dimensiunilor particulelor depuse pe suprafața epicuticulară (între 0,41 μm şi 1,68 μm); dimensiunile cele mai mici le au particulele de pe epiderma inferioară. Particulele de dimensiuni mici pot fi transportate pe distanțe mari de către curenții de aer înainte de a se depune, spre deosebire de particulele de dimensiuni mari care se depun mai aproape de sursă.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Frunzele investigate prezintă diferențe morfologice şi funcționale (legate inclusiv de adezivitatea cuticulară, de prezența, morfologia şi densitatea perilor tectori şi secretori). Frunzele cu aderență cuticulară mare colectează particule mai numeroase şi de dimensiuni mai mari. Un alt parametru important care trebuie avut în vedere la recoltare este vârsta frunzelor. Cele mature prezintă o concentrație mai mare de particule decât cele tinere (chiar dacă sunt asemănătoare ca dimensiuni) deoarece expunerea a fost mai îndelungată decât în cazul celor din urmă.

Un alt factor important de care ține acuratețea în prelucrarea probelor este momentul recoltării şi modul de prezervare. Frunzele recoltate după o ploaie sau un vânt puternic prezintă o concentrație mai scăzută de particule (îndeosebi cele de dimensiuni mari, mai slab aderente la suprafața cuticulară) decât cele recoltate după o perioadă mai îndelungată lipsită de precipitații şi de manifestări atmosferice deosebite.

Experimentele au demonstrat că, la frunzele colectate după prima ploaie ce urmează după o perioadă de secetă, particulele de dimensiuni mari şi cele care sunt solubile în apă sunt îndepărtate de pe suprafața cuticulară. De aceea trebuie bine cunoscut care este sensul şi gradul modificărilor în rezultatele obținute din probele recoltate în aceste condiții. Frunzele recoltate după ploaie (mai ales dacă aceasta este consecutivă unei perioade lungi de secetă) ca şi cele spălate artificial după colectare prezintă o concentrație mai scăzută de particule; de regulă acestea au dimensiuni mai mici decât cele de pe frunzele recoltate pe vreme uscată sau nesupuse spălării; de asemenea, se observă şi modificări în compoziția chimică a microparticulelor remanente pe frunze.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Concentrația particulelor de pe frunzele colectate de la același arbore înainte şi după o ploaie torențială se modifică dramatic. În studiul realizat de Johnson et al. (1999) concentrația particulelor la frunzele de *Fraxinus americana* colectate înainte de ploaie a fost, în medie, de 2100/mm^2 (martor). Imediat după ploaie a scăzut la 154/mm^2, pentru a creşte din nou după 7 zile lipsite de precipitații la 568/mm^2. Aceste date arată o scădere majoră a concentrației particulelor după o ploaie torențială.

Dimensiunile particulelor de pe frunze după ploaie descresc, de asemenea, față de frunza martor. Modificările au loc în același sens şi după o spălare artificială destul de energică.

Compoziția chimică elementară se modifică, de asemenea, după spălarea suprafeței foliare (fie naturală, fie artificială). Cantitatea de calciu din microparticule scade la frunzele colectate după ploaie, iar cantitatea de siliciu creşte.

Analiza comparativă a frunzelor spălate artificial a arătat următoarele: dacă se spală frunze colectate după o perioadă de secetă, modificările în ceea ce priveşte concentrația şi compoziția chimică a microparticulelor sunt similare cu cele observate la frunzele colectate după ploaie. Spălarea artificială a acestora din urmă nu mai induce modificări semnificative legate de parametrii menționați mai sus. Dimensiunile particulelor de pe frunzele spălate artificial nu variază strict în același sens cu cele de pe frunzele spălate natural de apa de ploaie.

O metodă de verificare a acurateței informațiilor obținute prin acest tip de experimente o reprezintă testarea în paralel a aceloraşi zone de investigare utilizând de această dată filtrele de aerosoli. Testele au arătat același sens al modificării concentrației şi dimensiunilor particulelor depuse

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

din aer ca şi probele de frunze analizate. Numărul absolut de particule depuse pe mm^2 al filtrelor nu este relevant, deoarece se utilizează metode diferite de colectare, însă sensul variației este similar. Dimensiunile medii ale particulelor din filtre sunt uşor mai scăzute decât ale celor de pe frunze, acest fapt datorându-se şi modului de colectare a acestora (prin flux de aer şi nu prin sedimentare pasivă ca în cazul frunzelor); filtrele au o eficiență sporită de colectare a particulelor de dimensiuni mici, tocmai datorită modului lor de funcționare.

Compoziția chimică elementară prezintă, de asemenea, unele variații. Particulele din filtre au prezentat o concentrație mai mare în sulf. Sodiul a avut o concentrație mai mare în special în zonele cu poluare mai redusă, în timp ce calciul a fost prezent în concentrații mari în zonele intens poluate, fapt observat şi în cazul particulelor analizate de pe frunze. Fierul a fost prezent în cantități mari la nivelul particulelor din filtre în zonele poluate, în timp ce pe frunze siliciul a predominat.

Compoziția chimică elementară a variat nu numai în funcție de gradul de poluare a zonei investigate, cât şi de proximitatea față de căile de trafic rutier sau feroviar; acestea sunt surse de poluare cu particule de dimensiuni reduse.

Spre deosebire de testele cu filtre, utilizarea frunzelor pentru a estima gradul de poluare cu pulberi într-o anumită zonă este mult mai accesibilă şi se poate realiza la un cost mult mai scăzut. Deşi unii parametri de caracterizare a particulelor diferă în filtre față de cele depuse pe frunze, sensul de variație este acelaşi şi indică aceeaşi ierarhizare a intensității poluării în zonele analizate.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

O categorie aparte de particule care influențează organismele vii, deşi sunt mai dificil de detectat prin metodele standard, sunt particulele ultrafine (UFPM), cu dimensiuni sub 100 nm. Detectarea acestor particule necesită microscoape cu baleiaj cu o putere de rezoluție mai crescută decât a microscoapelor SEM obişnuite. Pentru a examina UFPM este necesară utilizarea microscopului electronic cu transmisie (TEM) sau a unor microscoape cu baleiaj de tip Field Emission (FE-SEM). Pentru a obține informații complete, analizele se cuplează cu tehnici TOFMS (Time-of-flight-mass-spectrometry).

Pentru a observa aceste particule colectarea clasică prin filtre sau observațiile depunerilor de pe frunze nu sunt suficiente; filtrele HEPA rețin o mică cantitate din particule, însă modul în care se obțin probele le face inutilizabile pentru TEM (şi slab utilizabile pentru SEM).

O modalitate de colectare a particulelor ultrafine este utilizarea filtrelor de tip Nuclepore® cu grile de microscopie electronică ataşate. Grilele sunt acoperite în prealabil cu o peliculă de formwar. Particulele ultrafine depuse pe acestea pot fi direct observate la microscopul electronic cu transmisie.

Particulele ultrafine nu se regăsesc pe suprafețele foliare; ele pătrund în mezofil prin ostiolele stomatelor sau fac corp comun cu ceara epicuticulară, având o influență mult mai discretă asupra metabolismului foliar decât particulele de dimensiuni mai mari. În figura 7 se observă aspectul particulelor ultrafine din aerosolii din vecinătatea oraşului New York. Ele sunt asemănătoare cu cele descoperite în plămânii victimelor smogului londonez.

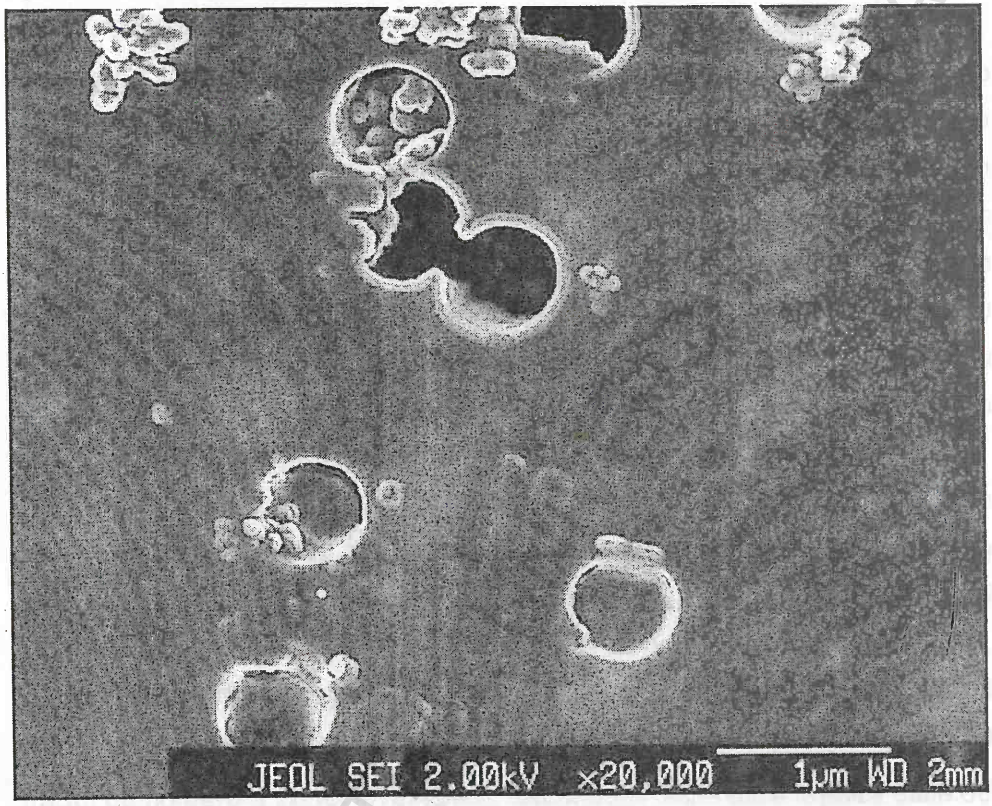


Fig. 7 - Aspectul electronomicroscopic al particulelor ultrafine din aerosolii din jurul oraşului New York.

BCU IASI / CENTRAL LIBRARY

III. 1. Identificarea microparticulelor implicate în procesele de poluare

Interpretarea cantitativă şi calitativă a rezultatelor analizei microparticulelor descoperite în probele biologice necesită o identificare cât mai precisă a acestora; de aceea au fost create baze de date cu caracteristici ale acestor particule, iar identificarea lor în diverse probe se reduce la o potrivire a caracteristicilor cu cele deja existente în bazele de date. Pentru particulele comune, cu unul sau mai multe minerale în compoziție, este de multe ori suficientă corespondența de formă şi structură chimică. Bazele de date referitoare la microparticule permit identificarea unor structuri puțin cunoscute şi complexe ce sunt detectate în probele biologice.

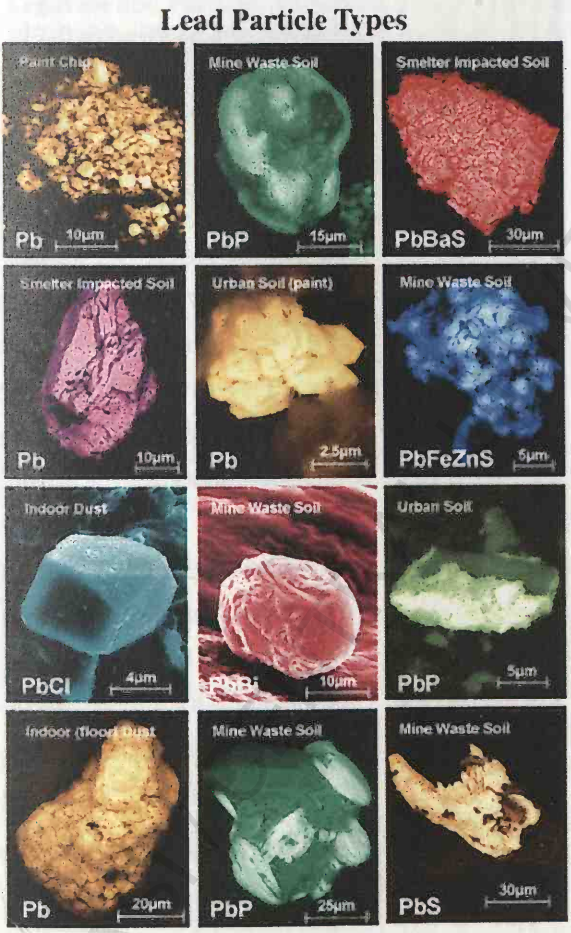


Fig. 8 – Tipuri de microparticule cu plumb (Abraham, 1998).

BCU LIBRARY

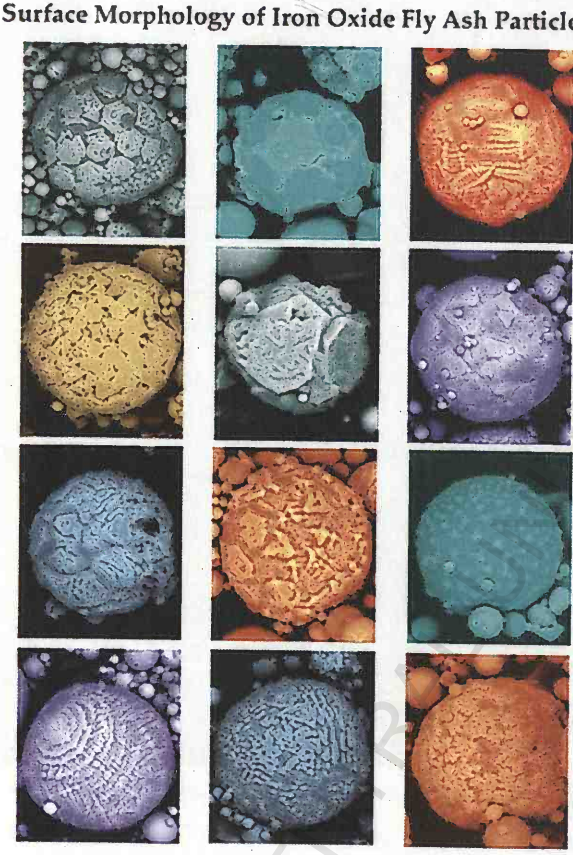


Fig. 9 – Morfologia particulelor de cenuşă acoperite cu oxizi de fier (Abraham, 1998).

Pentru a acoperi însă o parte cât mai mare din spectrul micro-particulelor identificabile în diverse categorii de probe, informațiile din aceste baze de date trebuie mereu actualizate, îmbunătățite şi completate. Descrierile cuprind atât imagini electronomicroscopice (SEM), cât şi spectrele în raze X pentru compoziția chimică elementară a microparticulelor; prin comparații realizate de calculator, se identifică cele mai asemănătoare profiluri morfologice şi structurale ale particulelor din probe cu datele existente în bazele deja constituite. Se ține cont de variația individuală atât a morfologiei, cât şi a compoziției chimice elementare în identificarea tipurilor de microparticule.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

De exemplu, particulele de plumb pot fi identificate relativ uşor pe baza formei şi a compoziției chimice. Spre deosebire de acestea, oxizii de fier ce acoperă particulele de cenuşă au forme morfologice diferite în funcție de sursa din care provin (fig. 9). Analiza micro-particulelor individuale din probele biologice poate îmbrăca două forme diferite: dacă toate particulele prezente sunt identificabile, analiza urmăreşte să determine proporția în care fiecare tip de particule e prezent în probe. Dacă o parte din particule nu sunt identificabile, atunci analiza este focusată pe identificarea acestora. În figura 10 este prezentat un astfel de tip de analiză; microparticulele au fost colectate dintr-o zonă bogată în plumb. Ele au fost analizate SEM, iar o ierarhizare de tip cluster a identificat şi grupat particulele cu similarități morfologice. Grupele de particule au fost

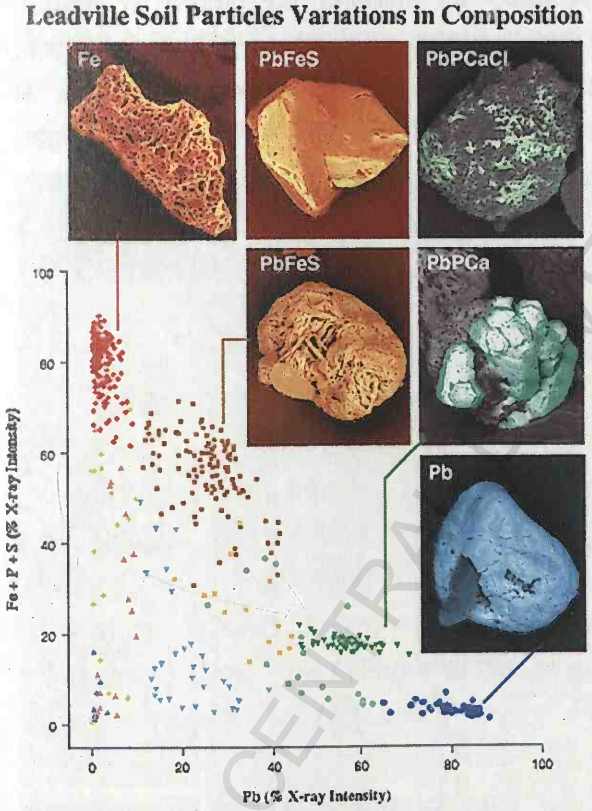


Fig. 10 – Variația morfologică şi structurală a microparticulelor din zona Leadville (Abraham, 1998).

caracterizate şi din punct de vedere al conținutului în plumb, fier şi sulf. Aranjarea finală a grupat în partea din dreapta jos particulele ce conțin predominant plumb (probabil carbonat de plumb), microparticule cu plumb – fosfor – calciu (± Cl) (probabil un mineral cu plumb şi fosfat), microparticule cu plumb – fier – sulf, puține particule cu plumb - mangan, Plumb – fosfor şi plumb – siliciu. De asemenea, au fost identificate şi particule conținând predominant alte tipuri de metale (fier, mai rar mangan şi zinc), grupate în regiunea din stânga sus a graficului. Odată identificate, aceste grupe de particule sunt înregistrate în bazele de date şi utilizate pentru clasificarea şi analiza altor microparticule ce provin din surse asemănătoare (the particle class balance receptor model).

III. 2. Cuticula şi interacțiunea ei cu poluanții atmosferici

Cuticula ce acoperă pereții externi ai epidermei organelor aeriene ale plantelor reprezintă principala barieră între interiorul organismului vegetal şi mediul extern. Există un contact permanent între suprafața cuticulară şi diverşii agenți poluanți din atmosferă. Dacă cuticula este afectată de interacțiunea cu aceştia, atunci modificările în structura sa pot fi considerate drept markeri ai poluării atmosferice şi pot servi la diagnosticarea acesteia.

Partea internă a cuticulei este caracterizată prin interacțiunea lipidelor din componența ei cu zona externă a peretelui celular ce conține pectină şi celuloză. Stratul următor din cuticulă poate fi uşor îndepărtat de pe peretele celular pe cale enzimatică; cel mai extern strat este format predominant din cutină şi ceară epicuticulară. Cutina, responsabilă de integritatea mecanică a cuticulei, este formată predominant din acizi graşi

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

esterificati; există însă şi o cantitate mică de acizi graşi liberi în matrixul cuticulei şi aceştia sunt responsabili de transportul transcuticular.

Ceara epicuticulară (destul de heterogenă, conținând o gamă variată de hidrocarburi saturate cu lanț lung de atomi de carbon, precum şi derivați ai acestora) este impregnată în partea externă a matrixului cuticular, formând un strat continuu deasupra acesteia; ea reprezintă bariera primară între factorii externi şi mediul intern al plantei. Deasupra cerii epicuticulare pot exista depuneri discontinue de ceară cristalină; aceasta joacă un rol important în interacțiunea frunzelor cu ploile acide şi intervine în reținerea poluanților solizi prin mărirea suprafeței active a cuticulei. Investigații asupra micro-morfologiei cuticulare la plante au fost realizate de numeroşi cercetători. Imaginile SEM trebuie să fie corect interpretate; în figura 11 (sus) se observă o frunză de nuc (*Juglans regia*) colonizată de micro-organisme, iar jos este

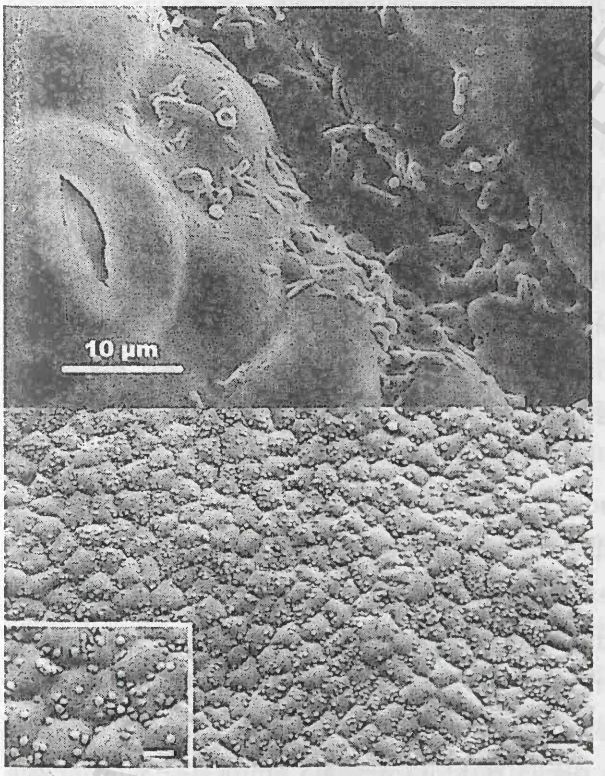


Fig. 11 – Imagini SEM ale suprafeței foliare de la *Juglans regia* (sus) şi *Taraxacum officinale* (jos) (sursa –web).

prezentat aspectul unei frunze de păpădie (*Taraxacum officinale*) acoperită cu microparticule de pesticide.

Structura cerii epicuticulare se schimbă odată cu vârsta plantei; inițial, aceasta are o structură fin-cristalină, însă, în timp, poate fi alterată în urma contactului cu ploile acide sau cu precipitațiile în general, prin abraziune mecanică datorată contactului cu microparticule purtate de vânt sau de contactul cu alte frunze sau suprafețe adiacente (Berg, 1989). În consecință, cristalele de ceară epicuticulară se degradează lent, în timp, iar acest fapt duce la modificarea aspectului frunzelor cât şi a afinității acestora pentru apă. Există diverse studii referitoare la diferențele de structură corelate cu afinitatea pentru apă a cuticulei la frunze din zonele poluate comparativ cu cele din zone nepoluate (Grill et all.,1987, Bermadinger et al., 1988, Bermadinger - Stabentheier,1995). Simptomele tipice sunt cele observate odată cu înaintarea în vârstă a frunzelor: fuzionarea cristalelor de ceară, cu formarea unui strat compact deasupra celui normal, neîntrerupt ce acoperă cuticula; acest strat de ceară poate ocluziona complet ostiola stomatelor sau poate închide camera suprastomatică atunci când stomatele sunt situate sub nivelul epidermei. Nu este încă cunoscut procesul prin care are loc această fuzionare şi nici modul în care diverşi agenți poluanți au proprietatea de a-l accelera; este posibil ca o reacție chimică dintre poluant şi ceara epicuticulară să inducă aceste modificări sau să fie implicate interacțiuni de ordin mecanic combinate cu creşterea şi scăderea umidității la acest nivel. Grill şi colaboratorii (1987) au investigat morfologia cerii epicuticulare la frunzele unor molizi sănătoşi comparativ cu frunzele unor arbori aflați în declin datorită poluării atmosferice în diferite zone ale Germaniei. Aceasta avea un aspect normal la arborii sănătoşi din zonele nepoluate, pe când la cei afectați s-au constatat modificări în sensul

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

că suprafața foliară avea aspectul morfologic întâlnit la frunze cu o vârstă mult mai mare decât cea reală a frunzelor analizate. În urma acestor constatări autorii concluzionează că starea cuticulei este un indicator al vigorii generale a plantei şi, în mai mică măsură, al gradului de expunere a acesteia la diferiți poluanți.

Bermadinger – Stabentheier (1995) a efectuat în paralel observații asupra cerii epicuticulare a frunzelor în diferite zone poluate şi nepoluate pentru a diferenția modificările induse de poluanți de diverse artefacte cauzate de daune mecanice sau chimice la nivelul suprafeței foliare. Experimental, a izolat în pungi permeabile pentru aer porțiuni de ramuri cu frunze, ferindu-le astfel de influența poluanților atmosferici. Acestea nu au prezentat modificările caracteristice pentru frunzele expuse (schimbarea morfologiei tubulilor de ceară, concreşterea sau strivirea lor).

Cercetările de microscopie electronică (S.E.M.) efectuate de Ivănescu şi Toma (2003) pe suprafețele frunzelor provenite de la diverse specii de gimnosperme ce manifestau defolieri mai mult sau mai puțin accentuate, precum şi de la indivizi cu cloroze şi/sau necroze foliare, au evidențiat rolul, deloc de neglijat, al depunerilor străine în declanşarea acestor fenomene.

Depunerile masive de praf de var şi ciment pe suprafețele frunzelor de la gimnospermele investigate în zona Bicaz obturează ostiolele stomatelor, modifică relieful cuticular caracteristic prin dezorganizarea modelului striațiilor cuticulare, modifică proporția dintre ceara cristalizată şi cea amorfă în favoarea celei din urmă care poate contribui, într-o anumită măsură, la obturarea ostiolelor, favorizează dezvoltarea unei microflore (fungi şi alge) care, odată instalată, acoperă porțiuni active fotosintetic şi

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

poate elibera o serie de substanțe toxice ce afectează starea generală a frunzei.

Deşi unii autori consideră ca normală apariția pe suprafețele foliare a unei microflore, există şi opinii conform cărora instalarea acesteia constituie un semnal de alarmă care atenționează asupra "suferințelor" fiziologice accentuate, ce nu prezintă manifestare fenotipică în timp; deci, un alt posibil răspuns la controversata problemă a defolierilor masive a arborilor.

Indiferent de natura chimică a noxei, instalarea acestei microflore constituie un indicator al senescenței timpurii a frunzelor şi o posibilă cauză a defolierilor ce au loc în plin sezon de vegetație. Este evident că, asemănător suprafețelor foliare, şi microflora instalată este supusă impactului cu noxele industriale care-i pot inhiba sau, dimpotrivă, stimula extinderea (Ivănescu şi Toma, 2003).

Observarea prezenței unei astfel de microflore doar pe suprafețele foliare de la indivizi cu simptome variate de "suferință", cauzate în mod cert de poluanții atmosferici, ne permite alăturarea constatărilor noastre la cele aparținând autorilor care consideră drept "normală" instalarea acesteia pe frunzele indivizilor asupra cărora noxele acționează sistematic.

- fenomene de uscare parțială la *Pinus sylvestris, Pinus nigra, Picea abies*;
- fenomene de uscare totală la *Pinus sylvestris, Abies alba, Picea abies*.

Uscarea parțială poate afecta vârful coronamentului (*Pinus sylvestris, Pinus nigra, Picea abies* - Bicaz), baza coronamentului *(Pinus sylvestris*) sau ramuri localizate la diverse niveluri ale coronamentului.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

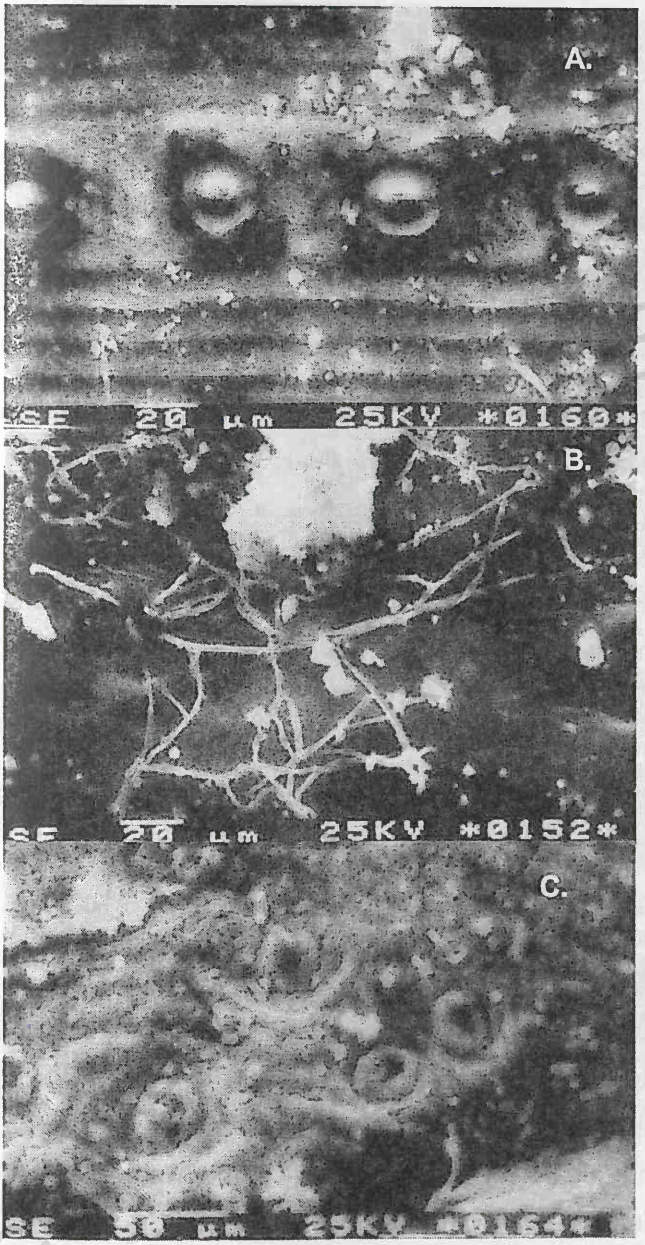


Fig. 12 – Aspecte SEM ale suprafeței foliare la *Pinus sylvestris*: A - fața adaxială, martor, B - fața adaxială, frunză poluată (Bicaz) – se modifică proporția dintre ceara cristalizată şi cea amorfă în favoarea celei din urmă ceea ce poate contribui, într-o anumită măsură, la obturarea ostiolelor, C – fața adaxială, frunză poluată (Bicaz) - Instalarea microflorei constituie un indicator al senescenței timpurii a frunzelor şi o posibilă cauză a defolierilor ce au loc în plin sezon de vegetație (Ivănescu şi Toma, 2003).

Fenomenele de uscare pot fi precedate sau nu de episoade de defoliere; atunci când pe suprafața frunzelor sunt vizibile semne de "suferință" (arsuri, necroze, cloroze), ne putem aştepta ca, într-un viitor apropiat, uscarea să-şi facă simțită prezența.

Riding şi Percy (1985) analizează efectul dioxidului de sulf asupra morfologiei cerii epicuticulare de la frunzele de *Pinus strobus* şi *Pinus banksiana*. Autorii prezintă un experiment de expunere controlată cu scopul de a detecta modificările ce au loc la nivel structural şi micromorfologic în frunzele acestor două specii de conifere. Au fost constatate diferențe semnificative între morfologia cerii epicuticulare de la frunzele plantelor-martor şi cele ale plantelor expuse la fumigare cu dioxid de sulf; în primul caz ceara epicuticulară are un aspect fin, granulat, camerele suprastomatice sunt deschise; după expunerea artificială la poluant, ceara epicuticulară devine amorfă, granulele şi tubulii sunt parțial fuzionați, de multe ori camerele suprastomatice sunt obturate, aspectul general este neregulat. Cantitatea de ceară epicuticulară depusă în camera suprastomatică este în strânsă legătură cu gradul de expunere la dioxidul de sulf; această modificare afectează profund metabolismul plantei căreia îi reduce simțitor schimburile de gaze necesare atât pentru respirație, cât şi pentru fotosinteză.

Crossley şi Fowler (1986) au analizat efectul pe care poluanții atmosferici îl au asupra cerii epicuticulare a frunzelor de doi şi trei ani de *Pinus sylvestris*. După un studiu preliminar pentru a stabili modificările normale ce apar în structura cerii odată cu înaintarea în vârstă a frunzelor, autorii au comparat, utilizând microscopul electronic cu baleiaj (SEM), aspectul acesteia la plante localizate în zone curate şi la plante din zone expuse cronic la ploi acide din Anglia.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

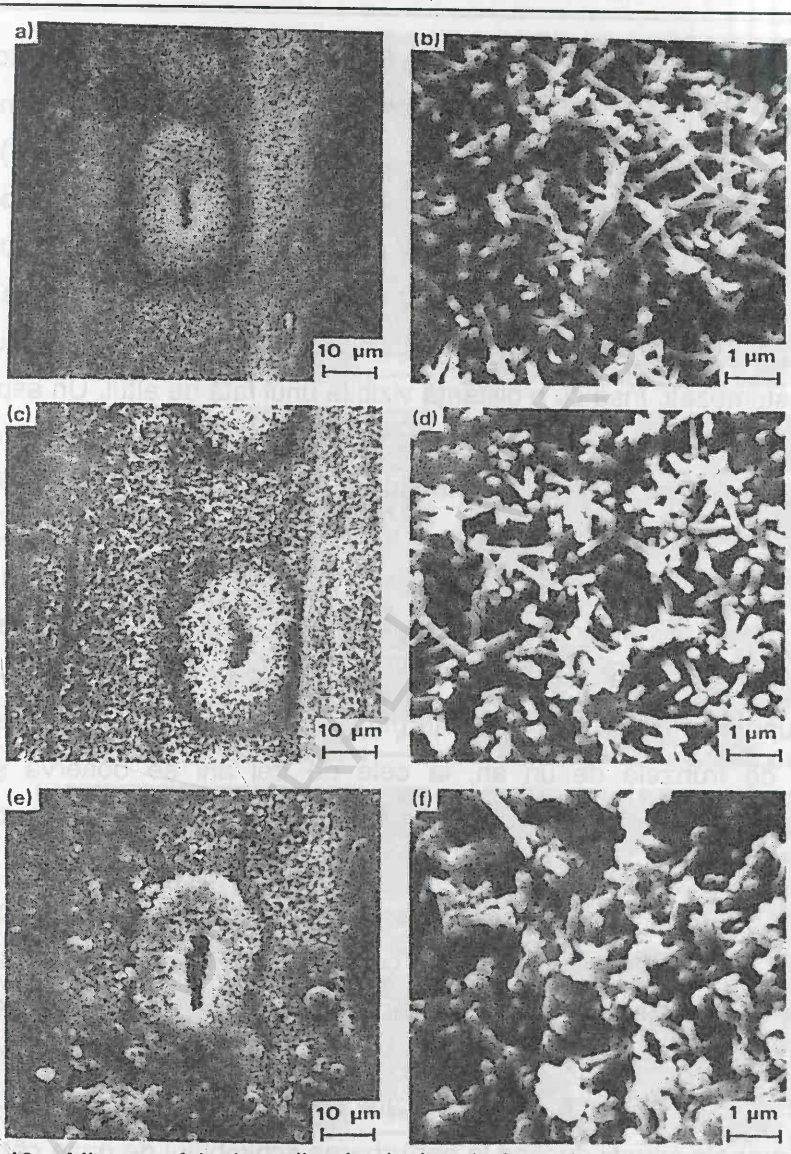


Fig. 13 – Micromorfologia cerii epicuticulare la frunzele de pin (*Pinus sylvestris*) de un an (a, b), respectiv doi (c, d) şi trei (e,f) ani dintr-o zonă curată (Crossley şi Fowler,1986).

Longevitatea frunzelor pe arbore diferă mult la plantele din zone curate față de cele din zonele poluate (50% din frunze ating 3 ani în zonele neafectate de poluare, față de numai 10% la plantele din zonele poluate).

Investigațiile electronomicroscopice au evidențiat modificări pe toată suprafața foliară şi în special la nivelul benzilor în care sunt situate stomatele. La frunzele arborilor din zona nepoluată, chiar şi la frunzele de trei ani (fig. 13), ceara ara aspect cristalin, microtubulii sunt fini, scurți, uneori anastomozati, însă cu o distanță vizibilă unul față de altul. Un aspect similar a fost observat şi la frunzele foarte tinere de la arborii din zonele poluate, ceea ce sugerează efectul nociv al poluanților atmosferici şi contribuția lor evidentă la modificarea micromorfologiei foliare în acest caz. Odată cu înaintarea în vârsta a frunzelor arborilor din zona curată se observă o uşoara tendință de apropiere a microtubulilor din ceara epicuticulară, fără însă ca aceştia să fuzioneze; cei de pe marginea camerei suprastomatice au o densitate din ce în ce mai redusă. În acelaşi timp, față de frunzele de un an, la cele de trei ani se observă şi o acumulare pe suprafața foliară a unor particule de origine necunoscută (probabil praf).

La frunzele arborilor din zonele poluate modificări semnificative încep să apară după primul an de viață; acestea constau în scurtarea şi aglutinarea progresivă a tubulilor din ceara epicuticulară, până la modificarea aspectului general de la cristalin la amorf (fig. 14, 15). Uneori, camera epistomatică este obturată de ceară amorfă, alteori aceasta este larg deschisă, ambele situații ducând la perturbarea schimbului de gaze cât şi a regimului hidric al plantei respective.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

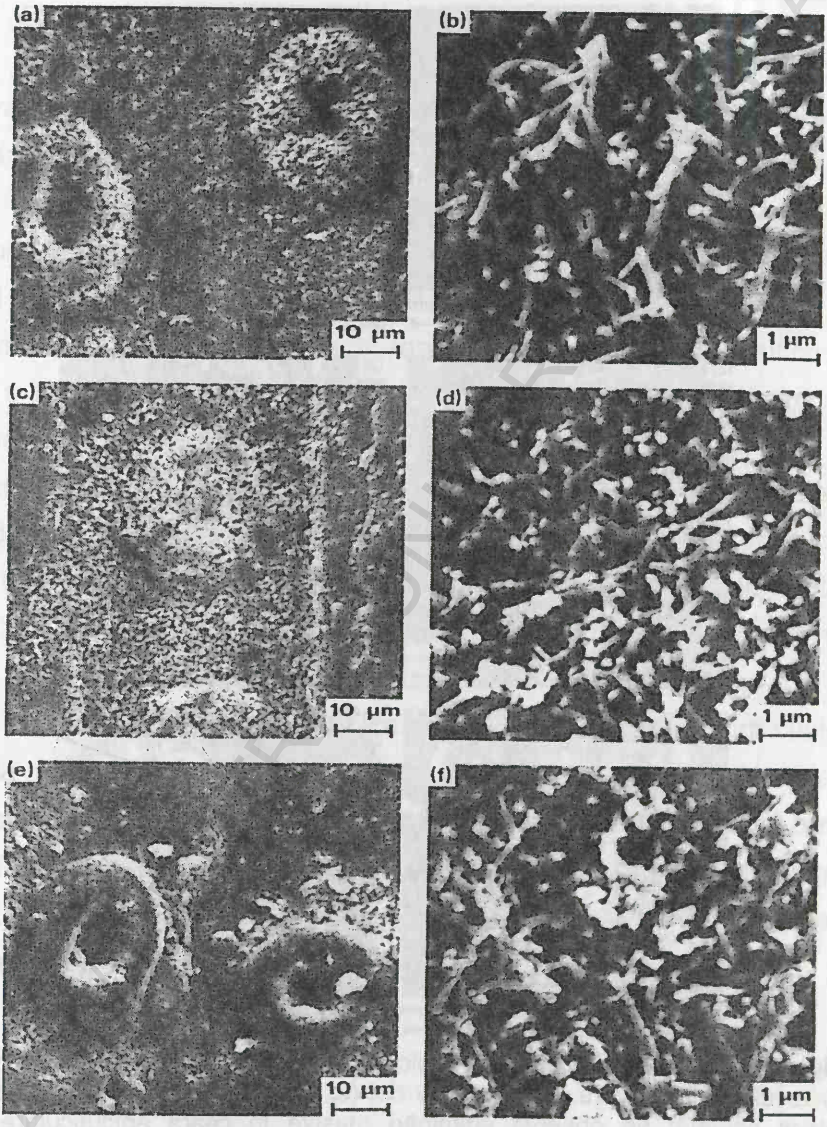


Fig. 14 - Micromorfologia cerii epicuticulare la frunzele de pin (*Pinus sylvestris*) de un an (a, b), respectiv doi (c, d) şi trei (e, f) ani dintr-o zonă mediu poluată (Crossley şi Fowler,1986).

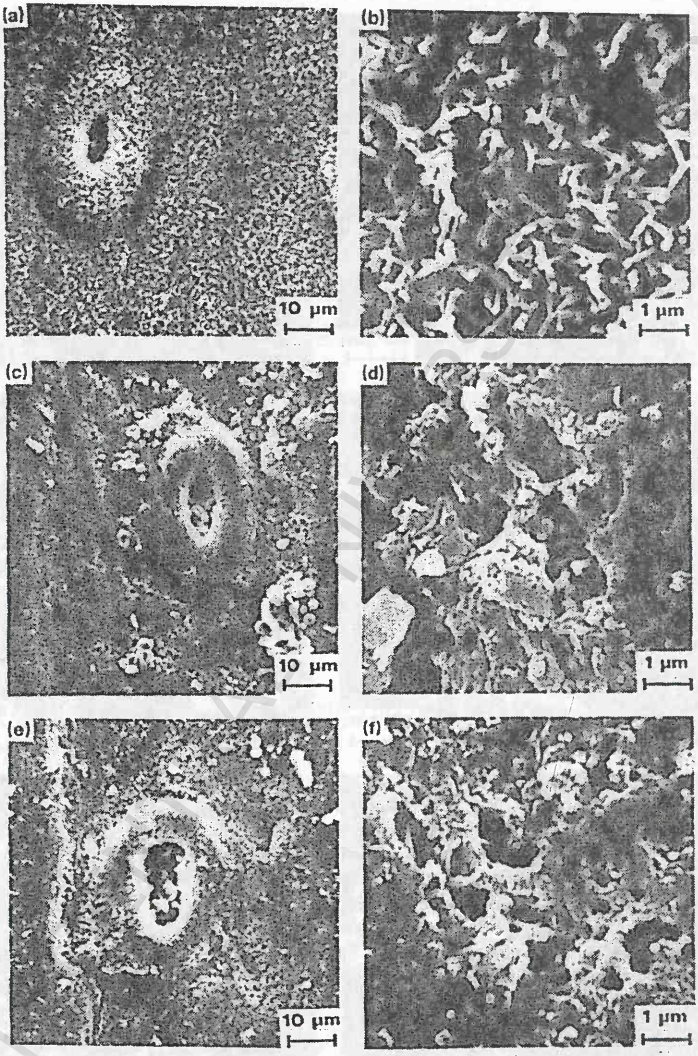


Fig. 15 - Micromorfologia cerii epicuticulare la frunzele de pin (*Pinus sylvestris*) de un an (a, b), respectiv doi (c, d) şi trei (e,f) ani dintr-o zonă intens poluată; se observă aglutinări masive în ceara epicuticulară şi aspectul amorf al acesteia (Crossley şi Fowler,1986).

În 2007 Paoletti et al. publică un studiu referitor la efectele ozonului asupra structurii cuticulei la frunzele de fag (*Fagus sylvatica*). Investigații similare au mai întreprins şi Percy et al., 2002, Schreuder et al., 2001.

Cercetările au fost efectuate pe clone obținute din două populații de fag, una adaptată la un mediu uscat (din zona Siciliei) şi alta la un mediu umed (din zona Toscanei). Influența condițiilor de viață originale nu a determinat modificări importante în reacția plantelor la tratamentul cu ozon (care s-a făcut în condiții de fumigare deschisă, în câmp). În ambele cazuri, pe măsura expunerii, s-au observat alterări ale structurii cuticulei şi a morfologiei cerii epicuticulare; stomatele au fost treptat ocluzionate prin închiderea ostiolei de către ceara epicuticulară. Acest fenomen duce, în timp, la scăderea eficienței fotosintezei, la scăderea ritmului schimbului de gaze şi la reducerea ratei metabolismului. Astfel frunzele mor mai devreme decât ar fi normal, iar arborii se debilitează.

Autorii propun şi o ierarhizare pe clase de afectare a modificărilor ce apar la nivelul aparatului stomatic şi a suprafeței cuticulare (clase de la 0 la 3, descrise pe scurt în figura 16). Clonele populației ce provine din zona cu umiditate redusă au dovedit o rezistență uşor crescută la acțiunea negativă a tratamentului cu ozon, în condițiile de irigare continuă în care s-a desfăşurat experimentul.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

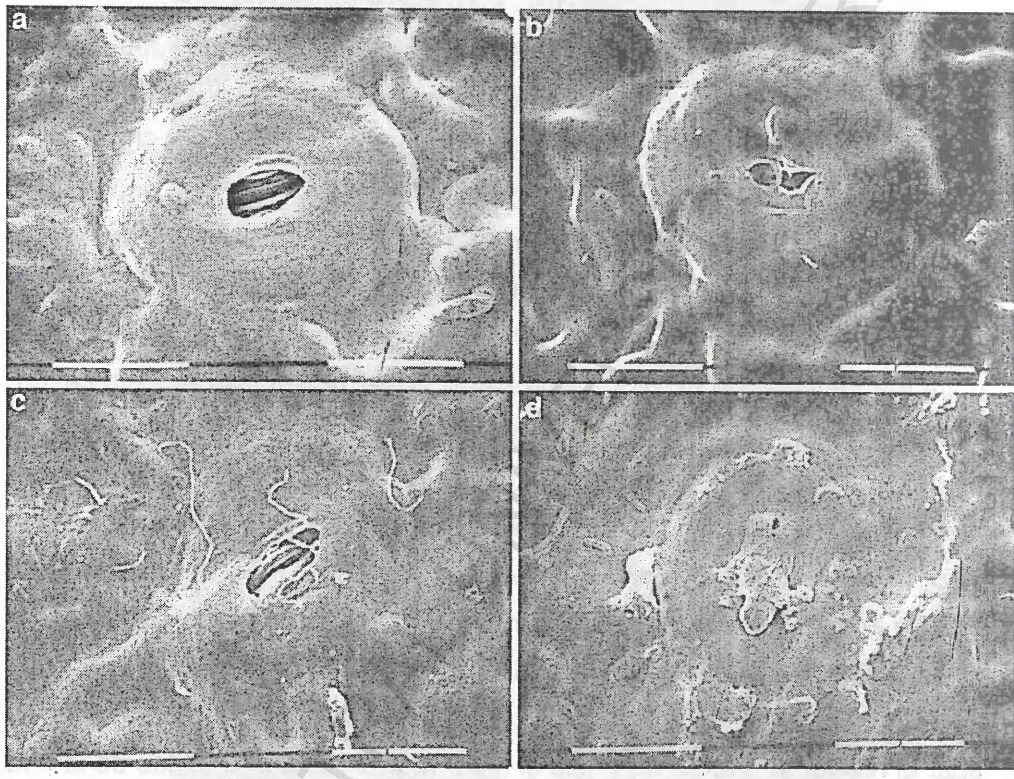


Fig. 16 - Gradul de afectare al stomatelor din frunzele de fag (*Fagus sylvatica*) expuse acțiunii ozonului: a – stomata normală (clasa 0) - fără semne de afectare (se observă stratul fin, continuu, de ceară epicuticulară, cu rare granule de dimensiuni mici); b – stomata slab afectată (clasa 1) – (stratul de ceară epicuticulară devine amorf, celulele stomatice şi cele anexe au un contur normal; c – stomată moderat afectată (clasa 2) – (ceara epicuticulară este amorfă, cu umflături şi alte tipuri de denivelări; deschiderea ostiolei este neregulată; celulele stomatice sunt deformate; celulele anexe au o formă normală); d – stomată grav afectată (clasa 3) – (ceara epicuticulară prezintă denivelări uneori exfoliate sub formă de plăci; ostiola este aproape complet închisă; celulele stomatice şi cele anexe sunt deformate) (scara = 10 µm) (Paoletti et al., 2007).

IV. Modificări induse de stres în metabolismul fenil-propanilor

Compuşii fenilpropanici reprezintă o clasă structurală de substanțe chimice cu o largă paletă de funcții biologice. Dacă luăm în considerare numai fenilpropanii a căror prezență în celule este cauzată de stres, mulți dintre aceştia sunt constitutivi în anumite tipuri de celule, sau pot ajunge să fie prezenți în organismul altor specii vegetale sau în alte țesuturi decât cele în care se regăseau în mod normal.

Toți fenilpropanii sunt derivați din acid cinamic, din care ia naştere fenilalanina în urma acțiunii enzimei fenilalanin-aminialaza (PAL). Acesta este punctul de legătură între metabolismul primar (calea shikimatului Herrmann, 1995) şi cel secundar (al fenilpropanilor – Harbone, 1988, Lewis şi Yamamoto, 1990). Relațiile biosintetice între diferitele clase de compuşi fenilpropanici sunt prezentate în figura 17; sunt menționate structurile reprezentative, dar substituenții pot varia de la o specie la alta.

Unii fenilpropanoizi simpli (cu schelet de carbon C6-C3) iau naştere din cinamat în urma unor procese succesive de hidroxilare, metilare, dehidrogenare; aceştia sunt acidul p-cumaric, acidul cafeic, acidul sinapic, acidul ferulic şi unele cumarine simple. Acizii liberi sunt rareori acumulați în cantități mari în interiorul celulelor vegetale; de regulă ei sunt conjugați cu zaharuri (salicilat de glucoză), cu carbohidrați din structura peretelui celular (esteri ferulici) sau cu acizi organici (acidul clorogenic). Acizii salicilic, benzoic şi p-hidroxibenzoic nu sunt fenilpropanoizi propriu-zişi, deoarece le

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

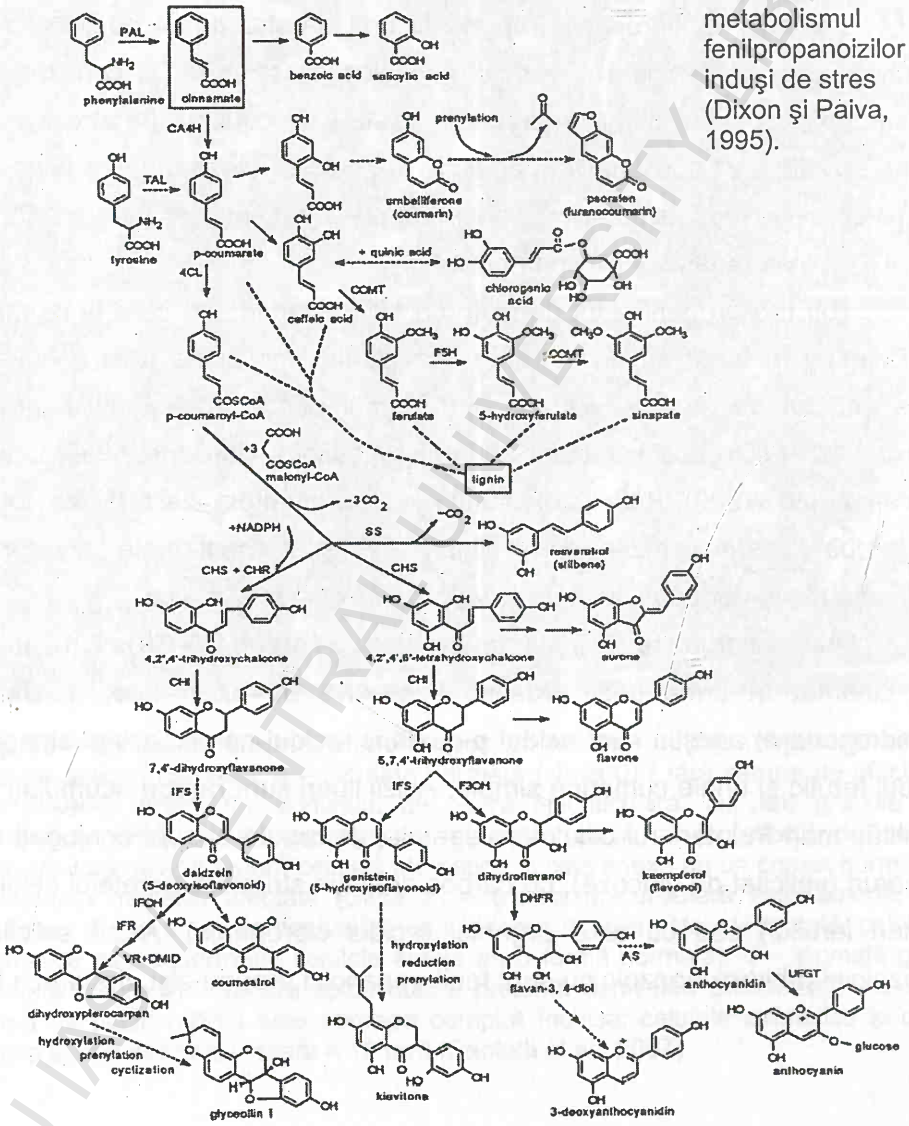


Fig. 17 - Relațiile biosintetice în metabolismul fenilpropanoizilor induşi de stres (Dixon şi Paiva, 1995).

lipseşte lanțul de trei atomi de carbon care provine de la cinamat sau p-cumarat (Yalpani et al., 1993). Lignina şi suberina sunt polimeri complecşi formați dintr-o mixtură de fenilpropanoizi simpli; compoziția lor variază de la o specie la alta (Whetten şi Sederoff, 1995).

Un mare număr de fenilpropanoizi a căror sinteză în celulele vegetale este indusă de stres derivă din scheletul cu 15 atomi de carbon ai flavonoizilor via calcon-sintetaza (CHS). La cele mai multe familii de specii vegetale produsul inițial al CHS este o tetrahidroxicalconă care ulterior este convertită în alte clase de flavonoide cum ar fi flavonele, flavononele, flavonoizii sau antocianii (Holton şi Cornish, 1995). Diversitatea structurală a fenilpropanoizilor este dată de o gamă largă de modificări ce au loc în cursul sintezei lor cum ar fi: hidroxilari regio-specifice, glicozilări, sulfatări, metilări etc.

Metodele clasice de biochimie combinate cu analiza chimică structurală duc la completarea cunoştințelor legate de căile de biosinteză a fenilpropanoizilor. Biologia moleculară şi cea genetică aduc noi date despre enzimele implicate în sinteza fenilpropanoizilor, despre situsurile celulare şi subcelulare de sinteză a acestora, despre rolul şi semnificația acestor compuşi în viața plantelor.

IV. 1. Funcțiile fenilpropanoizilor induşi de stres

O parte importantă din fenilpropanoizii a căror biosinteză este indusă de stres sunt grupați în clasa fitoalexinelor. Acestea sunt substanțe cu rol antimicrobian sintetizate ca urmare a răspunsului la atacul unui patogen. În această grupă sunt incluşi pterocarpanii, izoflavanii,

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

izoflavonoidele, flavonolii (cvercetin, kemferol), cumarina. Concentrația acestor substanțe creşte considerabil în zonele atacate de agenți patogeni, până la un nivel care devine toxic pentru aceştia (fapt demonstrat şi în

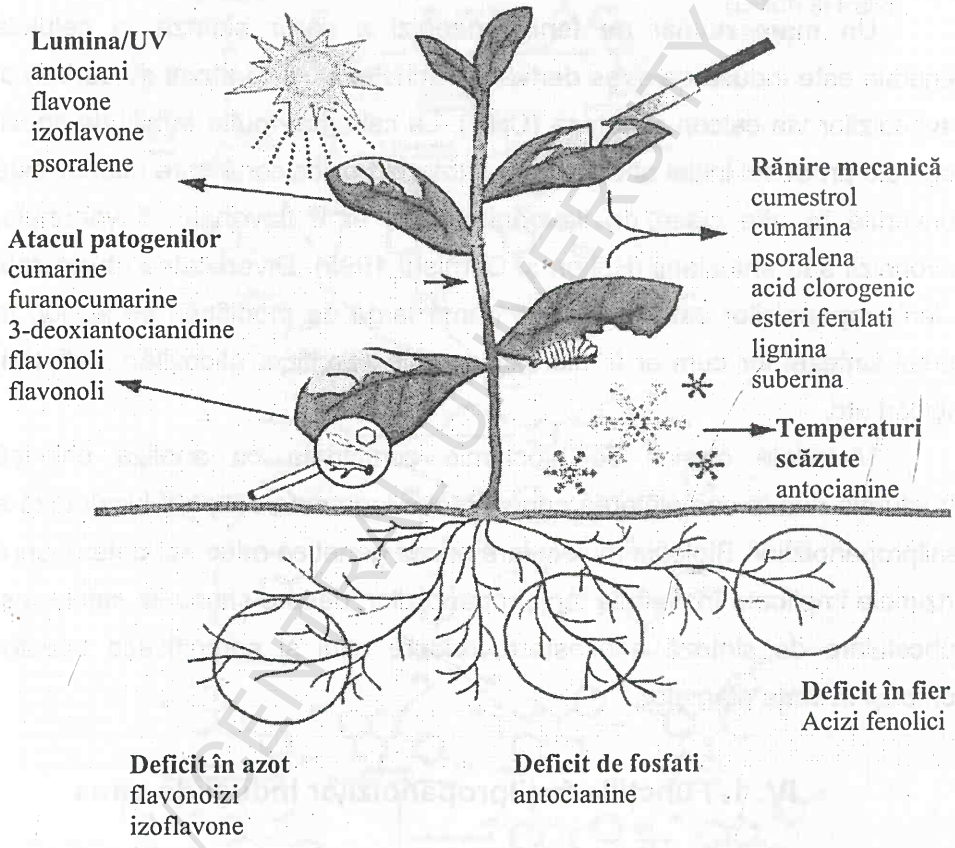


Fig. 18 – Exemple de fenilpropanoizi induşi de stres (Dixon şi Paiva, 1995).

urma experimentelor realizate în vitro). De exemplu, concentrația acidului salicilic crește foarte mult în organele vegetative de la *Nicotiana alata* și *Arabidopsis thaliana* ca urmare a unei infecții sau a expunerii la lumină ultravioletă (Yalpani et al., 1994, Rasmussen et al., 1991). Însă este luat tot mai mult în considerare rolul acidului salicilic în procesul de semnalizare ce are ca rezultat apariția rezistentei sistemice (SAR – systemic acquired resistance). În prezent se cunosc și alți compuși fenolici care joacă roluri similare în organismul vegetal.

În figura 18 sunt prezentate câteva tipuri de fenilpropanoizi a căror biosinteză în plante este indusă de stresul biotic sau abiotic.

Mulți fenilpropanoizi sunt sintetizați în plante ca o reacție de apărare împotriva animalelor ierbivore. Creșterea nivelului de cumarine și cumestrol este toxic pentru ierbivore cărora le provoacă hemoragii, scăderea capacității de coagulare a sângelui și chiar moartea.

Inducerea prin rănire a sintezei de acid clorogenic, esteri fenolici și esteri alkil ferulati este asociată cu rolul acestora de precursori în biosinteza ligninei și a suberinei, compuși polifenolici complecși cu rol de barieră (Bernards și Lewis, 1992).

Biosinteza și acumularea flavonoidelor (cum ar fi kemferolul și glicozidele sale) induse de polenizare în stigmatul de la *Petunia* sunt necesare unei dezvoltări normale a polenului. În același timp, aceste flavonoide au rolul de a împiedica dezvoltarea microorganismelor într-un mediu accesibil și bogat în substanțe nutritive (Vogt et al., 1994).

Nivelul de antociani și flavone crește ca răspuns al expunerii organismelor vegetale la lumină foarte intensă, iar prezența lor atenuează efectul ei nociv asupra celulelor fotosintetizante (Beggs et al., 1987). Acești

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

compuşi absorb radiaţiile UV (în special UV-B), conferind protecţie celulelor prin protejarea ADN-ului.

Alte forme de stres care induc biosinteza fenilpropanoizilor au fost insuficient studiate până în prezent. Nivelul antocianilor creşte consecutiv cu expunerea la frig şi stres nutriţional (în special scăderea cantităţilor de fosfaţi), însă motivul este deocamdată neclar. Alte categorii de stres nutriţional duc la creşterea concentraţiei de fenilpropanoizi în exudatele radiculare. Nivelul scăzut al fierului duce la eliberarea de acizi fenolici (posibil pentru a solubiliza ionii şi a facilita absorbţia lor).

IV. 2. Localizarea celulară a biosintezei fenilpropanoizilor

Iniţial, analizele fitochimice care au evidenţiat legătura dintre biosinteza fenilpropanoizilor şi stresul la care este supusă planta nu au urmărit şi localizarea celulelor în care această sinteză are loc efectiv. Ulterior s-a demonstrat că fitoalexinele se localizează cu precădere în apropierea zonei atacate sau a locului de infecţie. Similar, antocianii produşi ca urmare a acţiunii ultraviolete se cantonează, de regulă, în celulele epidermei superioare (Dixon şi Paiva, 1995). Însă nu este în totalitate cunoscut dacă aceste substanţe sunt sintetizate în celulele în care se regăsesc ulterior sau dacă sunt transportate în acestea după ce sunt produse de celule adiacente.

Tehnicile moderne de hibridizare *în situ* şi imunolocalizare au demonstrat că flavonoidele sunt produse şi acumulate în aceleaşi celule epidermice în urma acţiunii radiaţiilor UV (Wu şi Hahlbrock, 1992). În acelaşi mod a fost demonstrată sinteza şi acumularea furanocumarinelor şi

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

a fitoalexinelor în celule distincte din apropierea locului de infecție cu *Phytophtora megasperma* în frunzele de soia (Schmelzer et al., 1989). Aceste studii şi altele similare au arătat că fenilpropanoizii, a căror biosinteză este indusă de stres, se acumulează în aceleaşi celule care sunt produse.

Localizarea intracelulară a situri-lor implicate în biosinteza fenilpropanoizilor nu este încă foarte clară. Mulți fenilpropanoizi se acumulează în vacuole, de obicei sub formă de glicozide dar şi alte substanțe conjugate. Reacția finală de conjugare este de regulă legată de transportul acestor substanțe în interiorul vacuolelor. De exemplu, glucozil-transferaza şi malonil-transferaza implicate în sinteza conjugată a pterocarpanului sunt asociate cu tonoplastul ce delimitează vacuola (Barz şi Mackenbrock, 1994). Enzimele ce produc esterii sinapoil-malatului din sinapoil-glucoza sunt localizate exclusiv în vacuolă. Au fost realizate diverse studii legate de mecanismul de transport al antocianilor şi flavonoidelor în vacuole; acestea au arătat că transportul este activ şi implică, de regulă, activitatea unor proteine de transfer – numai unele forme acilate sunt transportate fără intervenția acestora. Însă vacuolele nu reprezintă un rezervor pasiv de stocate a produşilor secundari de metabolism doar în virtutea gradientului de concentrație şi a pH-ului. S-a demonstrat prin studii *în vitro* că vacuolele izolate din celulele soia şi de bumbac provenind din culturi celulare nu sunt capabile să preia antociani produşi de celule de morcov (Hopp şi Seitz, 1987). Deci există o specificitate ridicată față de tipul de substanțe ce pot tranzita membrana vacuolară.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

La unele specii antocianii sunt produşi în vezicule ce provin din vacuolă şi eventual fuzionează ulterior, prin coalescență, într-o formațiune mai mare, delimitată de o membrană simplă, numită antocianoplast. Acesta poate ulterior fuziona cu vacuola centrală colorând-o, mai ales în țesuturile senescente. La *Sorgum*, fitoalexinele (3-deoxi-antocianidina) se acumulează în astfel de vezicule colorate în vecinătatea zonei de infecție fungală. Cu cât cantitatea de fitoalexine creşte, cu atât culoarea acestor vezicule este mai intensă. Ele fuzionează treptat şi se deplasează spre locul în care se găseşte ciuperca, pentru ca în final conținutul acestora să fie deversat lângă agentul patogen. Cinetica şi comportamentul veziculelor le arată ca fiind sediul biosintezei antocianilor. Însă există şi alte enzime implicate în biosinteza acestora (cum ar fi antocianidin-metil-transferaza) cu localizare exclusiv citoplasmatică (Jonsson et al., 1983)

În acelaşi timp, unele enzime asociate cu sinteza pterocarpanilor şi a fucocumarinelor sunt localizate în membranele plastidelor. Deci sinteza fenilpropanoizilor este o cale metabolică complexă ce implică numeroase compartimente celulare.

Flavonoizii şi alți fenilpropanoizi sunt de mult cunoscuți ca având un rol important în apărarea plantei împotriva radiațiilor UV, deoarece ei se acumulează în special în celulele epidermice şi subepidermice din frunze şi tulpini, care sunt cel mai bine iluminate, şi absorb intens mai ales radiațiile ultraviolete din spectrul luminos. Această funcție a fost confirmată de numeroase studii; cele realizate de Lois (1994) la *Arabidopsis thaliana* au arătat că nivelul de flavonoide creşte semnificativ în frunze ca urmare a expunerii acestora la radiații UV. La această specie se cunosc mutante care sunt lipsite de anumite enzime implicate în biosinteza flavonoidelor.

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Ele se dezvoltă normal atunci când sunt protejate cu filtre față de radiațiile UV la care sunt mult mai sensibile față de tipul sălbatic, ceea ce demonstrează, o dată în plus, rolul important pe care îl au flavonoidele în protecția plantei față de acest tip de radiații.

Cele mai multe studii privind rolul protector al fenilpropanoizilor în plante au fost realizate pe baza activității biologice a acestora *în vitro*, corelate cu rata acumulării şi expresia rezistenței în aceleaşi condiții. Însă mecanismele de apărare ale plantelor *în vivo* sunt mult mai complexe şi de aceea este mai greu de stabilit strict care sunt componentele necesare şi suficiente pentru a conferi protecție.

IV. 3. Mecanisme de toleranță a plantelor la poluarea cu metale grele

Capacitatea de eliminare a metalelor nu este o caracteristică generală a organismelor tolerante la metale. Există o mulțime de organisme care, în loc să elimine metalele, le acumulează în concentrații mari în rădăcini şi în frunze (Lazar, 2002).

Reținerea în compartimentele subcelulare a metalelor, acolo unde nu există activități metabolice specifice în acest sens, ar părea paradoxală şi ar nega orice interacțiune a metalelor cu componentele importante pentru metabolism din interiorul celulei. Vacuola este locul de acumulare al metalelor grele, iar acest compartiment al celulei conține concentrații mari de liganzi organici care pot chelatiza metalele în forme solubile sau insolubile. Exemplarele tolerante la zinc de *Deschampsia caespitosa*

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

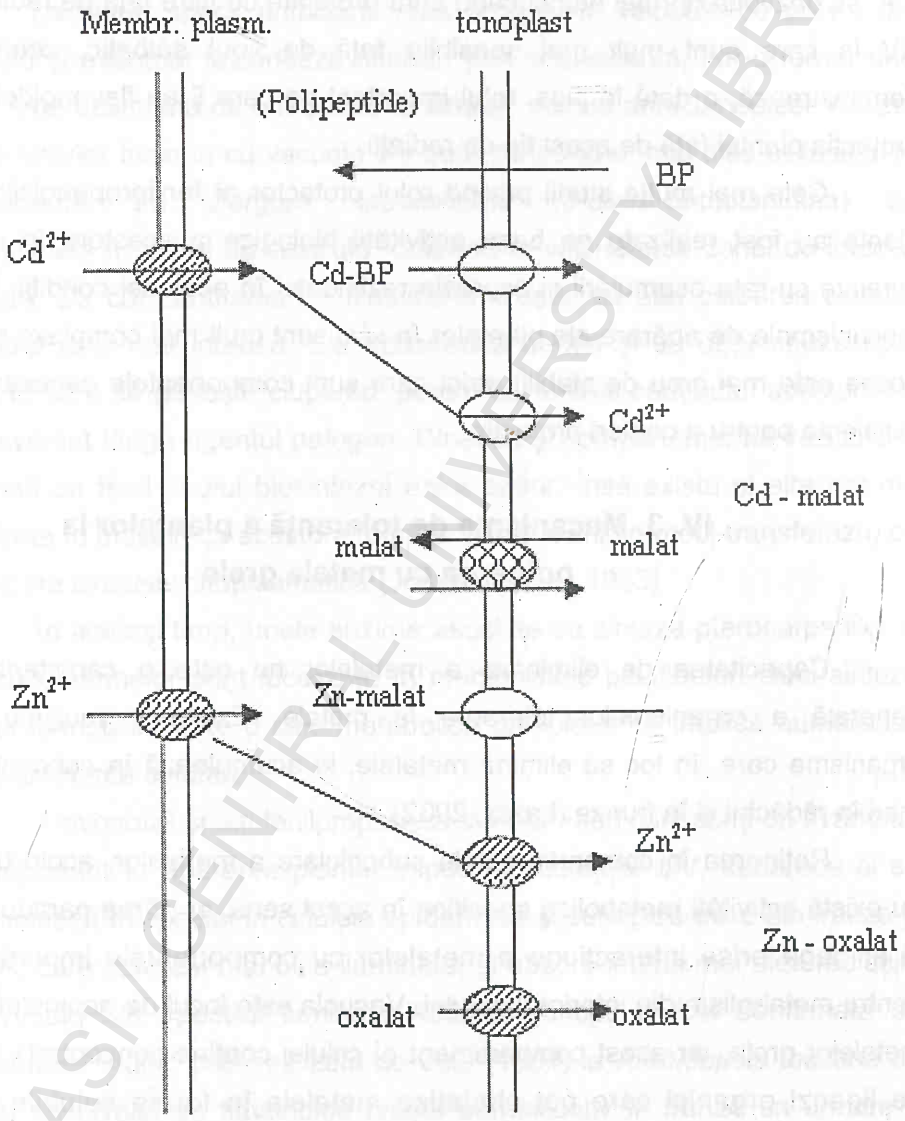


Fig. 19 - Model de toleranță a metalelor prin reținere în vacuolă (Vogeli – Lange şi Wagner – 1990).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

prezentau o aglomerare netă a metalului în vacuole comparativ cu exemplarele non-tolerante, în special după expunerea mai îndelungată.

S-a remarcat existența unor concentrații ridicate de malat în părțile aeriene ale ecotipurilor Zn – tolerante de *Silene* şi *Rumex acetosa*, comparativ cu tipurile non-tolerante şi s-a imaginat un model conform căruia malatul înlătură excesul de zinc deplasându-l din citoplasmă în vacuolă unde se leagă de anumiți liganzi cum ar fi citrații, oxalații, uleiuri sau antociani (Lazăr, 2002).

Vogeli – Lange şi Wagner (1990) au propus un model de polipeptide ce leagă metalul (fig. 19). Astfel, în cazul plantei *Nicotiana rustica,* cadmiul stimulează producția de proteine ce vor lega metalul şi-l vor transporta spre vacuolă unde compusul complex rezultat disociază, iar metalul formează produşi finali împreună cu acizii organici din acest compartiment (fig. 19).

Organismele nu numai că răspund la condițiile din mediul înconjurător, dar şi modifică mediul din imediata lor proximitate ca atare sau ca răspuns la un semnal extracelular. Producerea de biomolecule extracelulare poate efectiv altera proprietățile chimice ale metalelor din mediu.

Mecanismele de exudare a liganzilor organici solubili nu au fost pe deplin elucidate, deşi există dovezi certe că aceasta eliminare a metalului este în transă legătură cu potențialul electric al celulei şi este stimulat de depolarizarea acesteia.

Chelatizarea metalului reduce adesea absorbția sa de către celulă şi toxicitatea ulterioară, ceea ce reflectă o pierdere a reactivității metalului

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

față de anumiți constituenți celulari. Diferențele calitative şi cantitative în producerea de exudați pot conferi anumitor genotipuri toleranțe specifice.

Ionii metalici traversează într-adevăr membrana celulară şi trebuie, prin urmare, detoxifiați pentru ca funcționarea normală a celulei să fie asigurată. Mulți liganzi biologici au capacitatea de a lega metalele, dar reacțiile care pot avea loc sau stabilitatea acestor compuşi complecşi, felul în care aceştia ar putea evolua în condițiile biologice date nu se cunosc încă. Unii dintre aceşti liganzi pot fi considerați ca fiind rezultatul alterării metabolismului iar alții, din contra, ca răspunsuri de apărare ale celulei la expunerea la metale.

Caracteristicile de bază ale metalelor, şi anume acelea care le conferă un grad mare de toxicitate (ca de exemplu densitatea lor mare şi stabilitatea în liganzii biologici), pot permite sistemelor biologice să chelatizeze şi să detoxifice ionii metalici din citoplasmă.

Afinitățile metalelor față de anumite specii de liganzi, sau de anumite părți componente ale acestora, cum ar fi carboxilații, sulfhidrilii sau fosfații vor determina orientarea ionilor metalici înspre aceştia în scopul formării unor compuşi stabili.

Odată ajunse în interiorul celulei, metalele se pot afla în orice formă complexă, numai în stare de ioni nu. Folosindu-se cantități bine determinate de liganzi biologici, s-a observat că ionii de Al^{3+} şi Fe^{2+} s-au orientat spre formarea de hidroxizi, Cu^{2+} spre un complex glutamic, Mn^{5+} spre un complex asparaginiciar Zn^{2+} a format un complex cu alanina (Lazar, 2002).

Există puține cazuri când nivelurile de liganzi organici să nu fie corelate cu capacitatea genetică a plantelor de a tolera metale.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

IV. 4. Identificarea histochimică a fenolilor

Meyer, în 1864, a demonstrat că fenolii (în special tirosina), în combinație cu clorura de mercur şi nitratul de potasiu, în soluție acidă, dau o culoare roşie, caracteristică. Mirsky şi Pollister (1946) (cf. Baker, 1956) au utilizat sulfatul de mercur, acidul sulfuric şi nitratul de sodiu pentru identificarea tirozinei. Însă rezultatele erau concludente doar pe materialele fixate în prealabil în formaldehidă. Pentru a înlătura acest neajuns, Pollister şi Ris (1947) (cf. Baker, 1956) au înlocuit acidul sulfuric cu acidul tricloracetic. Când secțiunile sunt încălzite în acest amestec, culoarea începe se apară la 50^0C şi devine foarte intensă la 90^0C. Rezultate foarte bune sunt obținute când secțiunile sunt fierte în acest amestec. Însă metoda nu se poate aplica secțiunilor incluse în parafină sau a celor obținute la criomicrotom, deoarece le distruge integritatea structurală. Colorația obținută este permanentă dacă se utilizează ca mediu de includere balsamul de Canada sau glicerina pură.

Soluțiile necesare pentru identificarea histochimică a fenolilor sunt (Baker, 1956):

- formaldehida salină (obținută din 10 ml formaldehida, 83 ml apă distilată, 7 ml clorura de sodiu 10%);
- sulfatul de mercur (se adăugă 10 ml acid sulfuric în 90 ml apă distilată; se amestecă cu 10 g sulfat de mercur; se încălzeşte până la dizolvare; se răceşte soluția astfel obținută; se adăugă 200 ml apă distilată);
- nitratul de sodiu (25%, soluție apoasă).

BCU IAŞI GH. ASACHI TECHNICAL UNIVERSITY LIBRARY

Metoda de lucru:

- se fixează probele în formaldehidă salină peste noapte;
- se secționează la 20-30 μm; secțiunile se pot păstra în alcool 70-80%;
- se trec secțiunile în apă distilată;
- se pun 5ml soluție de sulfat de mercur într-un pahar Berzelius de 50 ml;
- se adaugă 5 ml soluție nitrat de sodiu;
- se pun secțiunile în pahar; se încălzeşte paharul la fierbere pe o placă de azbest;
- se răceşte soluția cu secțiuni;
- se spală în apa distilată de trei ori (aproximativ 2 min. în fiecare baie);
- se includ în glicerină sau, după deshidratare, în balsam de Canada.

Culoarea compuşilor fenolici este roşie, roz până la portocalie.

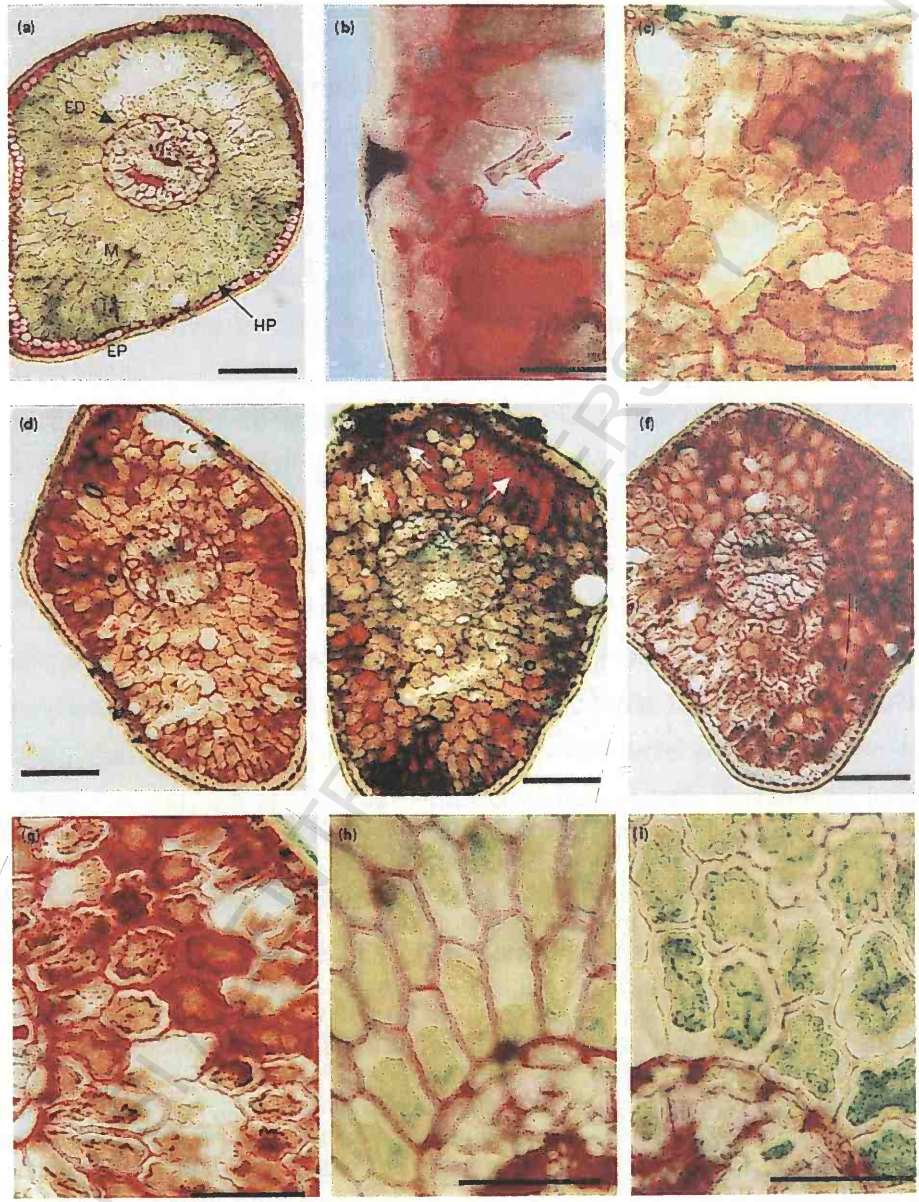
Soukupova şi colaboratorii (2000) utilizează o altă metodă pentru identificarea histochimică a fenolilor în frunzele de molid (*Picea abies*) afectate de poluarea atmosferică. Aceştia, în reacție cu Fast Blue BB Salt (soluție apoasă), dau o culoare roşie spre maroniu. Taninurile condensate au fost identificate cu vanilină şi acid clorhidric. Deoarece reacția vanilinei cu taninul necesită un mediu foarte acid, acesta poate determina plasmoliza celulelor analizate (ceea ce va fi considerat un artefact). În urma reacțiilor histochimice compuşii fenolici au fost identificați atât în citoplasmă, cât şi în pereții celulelor din mezofilul asimilator. De regulă, s-a constatat o grupare a celulelor ce conțin polifenoli în apropierea epidermei (fig. 20).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Fig. 20 - Secțiune transversală prin frunze de molid (*Picea abies*) recoltate din zone cu grade diferite de poluare (observații la microscopul fotonic – câmp luminos): a – frunză de trei ani dintr-o zonă intens poluată (lignina este colorată în roşu cu fluoroglucină); b – frunză de doi ani, dintr-o zonă slab afectată; se observă aparatul stomatic cu camera suprastomatică complet obturată (compuşii fenolici sunt colorați cu Fast Blue BB); c – frunză de un an din aceeaşi zonă – compuşii fenolici se colorează în roşu şi brun (cu Fast Blue BB); d – frunză de un an dintr-o zonă slab afectată; e – frunza de trei ani dintr-o zonă afectată de poluare (celulele din mezofil acumulează polifenoli colorați în brun cu Fast Blue BB); f – frunză de un an dintr-o zonă neafectată; g - detaliu din celulele din mezofil; h, i – frunze de trei ani dintr-o zona neafectată (h) şi una puternic afectată (i) – se observă în ultimul caz o scădere a gradului de lignificare a pereților celulari (colorați cu fluoroglucină).

⇨

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY


(a)
ED
M
HP
EP
(b)
(c)
(d)
(f)
(g)
(h)
(i)

V. Markeri biologici morfologici, structurali şi ultrastructurali utilizaţi pentru evaluarea impactului antropic asupra ecosistemelor

Utilizarea biomarkerilor în cuantificarea impactului antropic asupra diverselor ecosisteme a fost relativ recent introdusă în cercetarea ştiinţifică pe plan mondial. Iniţial, în conceptul de biomarker intrau doar metaboliţi, enzime sau alte substanţe ce puteau fi utilizate pentru stabilirea gradului de interacţiune dintre unele substanţe chimice şi sistemele biologice, după cum se arată în raportul „Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles" prezentat la Geneva în 1993 de către OMS. În ultimii ani, această categorie de indicatori a început să se extindă, înglobând, pe lângă markerii biochimici şi o serie de markeri structurali şi în special ultrastructurali, cuantificabili, ce pot întregi tabloul interacţiunii complexe dintre diferitele substanţe chimice şi organismul viu. Pe lângă implicaţiile în medicină şi în farmacologie, primele de altfel ale biomarkerilor, aceştia au început să fie tot mai mult utilizaţi în evaluarea impactului pe care îl are poluarea asupra biodiversităţii din diferite ecosisteme, acvatice sau terestre. Ei pot confirma expunerea (şi implicit gradul de afectare) unui organism individual sau a unei populaţii la diferite substanţe chimice. Valorile cantitative indicatorilor consideraţi boiomarkeri facilitează stabilirea unor relaţii între dozele aplicate şi amplitudinea răspunsului organismului afectat în special la nivel celular şi subcelular.

Procesul de selectare şi apoi de validare a biomarkerilor necesită o grijă deosebită faţă de sensibilitatea şi specificitatea lui în a cuantifica gradul de interacţiune între organismul viu şi substanţele străine la care acesta a fost expus. Dacă biomarkerii prezintă o corelare semnificativă (temporară şi spaţială) cu modificările evidente ce apar în diferite

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ecosisteme sub influența poluanților, atunci ei vor putea fi folosiți pentru detectarea fazelor incipiente de afectare, înainte ca modificările vizibile să fie evidente (Cape, 1989). Odată identificați, biomarkerii pot fi utilizați în populații pentru screening (determinări randomice) sau pentru monitoring (determinări dirijate la anumite intervale de timp pentru a observa o dinamică a răspunsului specific).

Direcțiile principale de cercetare pe plan mondial vizează evidențierea răspunsului adaptativ la al indivizilor la modificările ce au loc în mediu sub influența agenților poluanți. Acesta se manifestă la diferite niveluri:

- morfologic, structural şi ultrastructural (fluctuații ale simetriei, modificări la nivelul cloroplastelor, mitocondriilor, variații ale parametrilor nucleolari - număr, dimensiuni, procentul de celule cu nucleoli heteromorfici) ;
- biosintetic, ce poate fi evidențiat prin studii biochimice (determinări enzimatice - catalaza (CAT) şi peroxidaza, superoxid dismutaza (SDO), acetil colinesteraza (AcHE), sau determinări ale unor proteine considerate indicatori ai răspunsului adaptativ).

Există în prezent intenția de a standardiza ca biomarkeri modificări structurale ce apar la nivelul organelor atât la animale (Tricklebank, 2001), cât şi la plante (Rautio et. al, 2002). Acest fapt se justifică şi prin accesibilitatea analizelor ce trebuie efectuate, deoarece acestea au un cost mult mai scăzut şi un grad de dificultate mai redus decât determinările biochimice sau ultrastructurale. S-a constatat că asimetria fluctuantă poate reprezenta un răspuns direct la deteriorarea calității mediului ambiant. Ea se manifestă nu numai prin devieri macroscopice de la legile simetriei, ci şi

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

prin modificări în paternul distribuției stomatelor şi a perilor (tectori şi secretori). Acest fapt duce la scăderea rezistenței plantelor la atacurile paraziților şi la alterarea mecanismelor de apărare contra erbivorelor. În consecință, pot apărea defolieri care nu prezintă o cauză evidentă. Hodar (2002), analizând influența stresului asupra gradului de asimetrie fluctuantă (AF) a frunzelor de la *Quercus ilex* din zona mediteraneană, evidențiază modalitățile de utilizare a AF ca bioindicator al calității într-un habitat. De asemenea, Kozlov et al. (1996) evidențiază creşteri evidente ale AF la mesteacăn sub influența factorilor poluanți.

Aspectele ultrastructurale ale impactului poluării asupra organismelor vii au fost studiate sub două aspecte: de evidențiere a modificărilor ce apar la nivelul diferitelor organite celulare în condiții de mediu modificate (Stirban et al., 1988, Poppe et al., 2002, De La Cruz, 2002, Rinnan, 2004), sau de furnizare a unor biomarkeri ultrastructurali pentru cuantificarea gradului de afectare a ecosistemului (Schramm et al., 1998, Wai, 2000).

V. 1. Markeri morfologici

Stabilitatea structurală sau homeostazia se referă la capacitatea unui individ de a manifesta un fenotip constant în anumite condiții de mediu (Graham et al., 1993). Stabilitatea structurală redusă poate fi consecința acțiunii unei game variate de factori de mediu şi/sau genetici (Valentine et al., 1973, Yablokov, 1986, Clarke, 1992, 1993).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

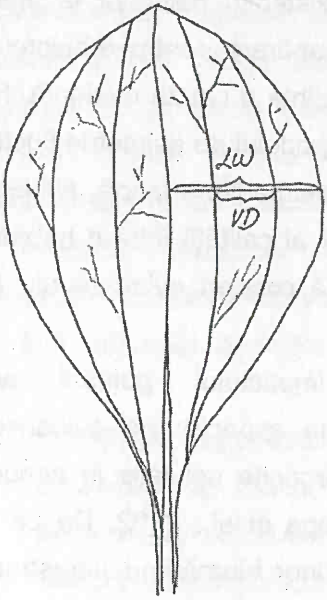


Fig. 21 – Model de măsurare a parametrilor necesari determinării asimetriei fluctuante la frunza de pătlagină (*Plantago major*) (Velickovic şi Perisic, 2006).

Asimetria fluctuantă (FA), asimetria direcțională (DA) şi antisimetria (AS) sunt cunoscute ca cele mai frecvente tipuri de asimetrii morfologice legate de interacțiunea cu factorii de mediu. Fiecare din acestea se caracterizează prin combinații diferite de medii şi variante ale parametrului R - L (unde R = jumătatea dreaptă a unui organ vegetativ şi L = jumătatea stângă). Asimetria direcțională (DA) este caracterizată printr-o distribuție normală a parametrului R - L, unde media diferă semnificativ de 0. Antisimetria (AS) este asociată cu o curbă bimodală a parametrului R-L. Asimetria fluctuantă (FA) se manifestă când diferențele de dezvoltare dintre cele două jumătăți presupus simetrice ale unui organ vegetal sunt distribuite randomic. Această din urmă formă de asimetrie este propusă ca indicator al stresului indus de factorii de mediu (Leary şi Allendorf, 1989). În paralel, asimetria fluctuantă a fost utilizată pentru a estima instabilitatea structurală a unui organ sau chiar a unui organism cu simetrie bilaterală care, în urma perturbărilor în dezvoltarea sa, este incapabil să producă un fenotip determinat.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Variațiile fenotipice ale indivizilor unei specii pot fi compartimentate în trei categorii: cu cauză genetică, produse de mediu sau produse de interacțiunea genotip-mediu (Lajus et al. 2003). Factorii de mediu la rândul lor pot fi clasificați în micro–variații, macro-variații şi procese randomice. Influența celor din urmă asupra variației fenotipice a unui organism se poate estima prin măsurarea deviațiilor de la simetria bilaterală perfectă; variațiile se încadrează în grupa asimetriei fluctuante.

La plante, asimetria fluctuantă a fost utilizată pentru a evalua instabilitatea structurală a florilor sau a frunzelor (Sakai şi Shimamoto, 1965, Bagchi et al., 1989, Freeman et al., 1993, Møller şi Eriksson, 1994, Sherry şi Lord, 1996).

Utilizarea asimetriei fluctuante ca un indicator al calității unui anume habitat este utilă mai ales în cazul speciilor ce manifestă o largă răspândire, care tolerează o multitudine de condiții de mediu (specii cosmopolite) (Hodar, 2002). Calitatea unui habitat se referă la capacitatea acestuia de a furniza condiții cât mai favorabile pentru existenta indivizilor şi a populațiilor unei specii (Krausman, 1999). Printre cauzele cunoscute care determină asimetria fluctuantă la plante enumerăm: temperatura, nutrienții, variația intensității luminoase, factori genetici (mutații, hibridizări), influența poluanților (Møller şi Swaddle, 1997). Investigațiile asupra asimetriei fluctuante sunt uşor de realizat, necostisitoare şi de aceea sunt frecvent folosite pentru monitorizarea nivelului de stres în diverse ecosisteme (Kozlov et al., 1996, Parsons, 1992, Hochwender şi Fritz, 1999). Principala problemă în utilizarea asimetriei fluctuante este dificultatea decelării modificărilor produse de factori genetici de cele induse de agenții poluanți.

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Stresul indus de mediu trebuie să aibă o intensitate suficient de mare pentru a produce modificări ale FA.

Teoretic, asimetria fluctuantă ar trebui să fie cu atât mai intensă cu cât factorii de stres se manifestă mai pregnant. Însă, de cele mai multe ori, condițiile adverse de mediu pot afecta procesul de evoluție a speciei, selectând genotipurile cele mai rezistente, care se adaptează cel mai uşor noilor condiții. De aceea în mediile mai stresante se regăsesc adesea indivizi mult mai simetrici, care sunt mai bine adaptați (Møller şi Swaddle, 1997).

Parson (1992) sugerează că o creştere a asimetriei fluctuante are loc numai în cazul existenței unui factor de stres extrem într-un ecosistem. Stabilitatea structurală, măsurată prin intermediul asimetriei fluctuante, este de aşteptat să fie mai redusă în cazul expunerii la stres; însă datele concrete din literatură evidențiază o scădere a FA în acest caz (Hendrickx et al., 2003). Rezultate ce reflectă o corelație pozitivă între FA şi stresul indus de factorii de mediu au fost obținute de câțiva cercetători care au investigat asimetria la nivelul frunzelor sau a florilor (Møller, 1995; Møller şi Eriksson, 1995). În cazul florilor s-a constatat că insectele preferă florile simetrice celor asimetrice, pe care poposesc un timp mult mai îndelungat; acest fapt le asigură implicit un mai mare acces la transmiterea genelor spre generațiile următoare. Însă cele mai multe studii nu au evidențiat o creştere a FA consecutivă cu supunerea indivizilor, speciei sau ecosistemului la un stres moderat (Hochwender şi Friz, 1999; Alados et al., 2001; Valkama şi Kozlov, 2001).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

V. 1.1. Studii de caz

În 2006, Velickovic şi Perisic publică un studiu privind asimetria fluctuantă ca indicator al calității unui habitat. Zona investigată este situată lângă autostrada Zagreb-Belgrad, unde traficul auto este deosebit de intens. Poluanții prezenți în zonă afectează atât solul, cât şi aerul, influențând vegetația terestră; zonele din apropierea autostrăzilor suferă de poluare cronică, sezonieră dar şi accidentală; sarea din soluțiile de împiedicare a înghețului, plumbul din carburanți sunt frecvent asociate cu drumurile intens circulate, dar la factorii poluanți se adăugă şi nichelul, cuprul, zincul, uleiurile, cadmiul (Bellinger et al., 1982). Clorura de calciu şi de sodiu poate influența dezvoltarea vegetației atât prin contaminarea solului, cât şi a apei sau prin contact direct cu aparatul foliar. O concentrație crescută de sodiu în sol poate deveni toxică pentru plante. Plumbul poate înlocui calciul, iar dacă particulele cu plumb sunt foarte mici, ele pot intra în mezofilul frunzei prin ostiola stomatei.

Martorul a fost recoltat de pe malul unei ape curgătoare, o zonă curată, cu precipitații bogate, departe de orice sursă cunoscută de poluare. Pentru analiză a fost aleasă pătlagina (*Plantago major*), o specie cu o largă răspândire în arealul investigat. Din fiecare locație au fost recoltați 25 de indivizi, iar de la fiecare plantă a fost măsurată câte o frunză (fiecare având 5 nervuri mari). Zona acoperită a fost de 1 ha în ambele cazuri. Frunzele au fost presate, uscate şi apoi măsurate. Măsurătorile au fost făcute pentru cele două jumătăți ale limbului foliar, precum şi pentru distanța dintre nervuri (fig. 21).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

La probele analizate s-a constatat o tendință de creşterea a FA în zonele nepoluare, comparative cu zonele afectate de poluare. Aceste rezultate sunt în concordanță cu observațiile făcute de Møller şi Swaddle în 1997 care menționau că organismele supuse unui stres cronic se adaptează, devenind mai simetrice; astfel, poluarea poate fi privită ca un factor de selecție naturală, a cărui acțiune favorizează organismele mai rezistente, cu o zestre genetică mai valoroasă. Posibilitatea de adaptare locală la acest tip de stres sugerează că asimetria fluctuantă poate servi în diagnosticul gradului de toleranță la stres a diverselor specii vegetale.

Lens (2002) arată că interacțiunea dintre genotip şi mediu poate fi suficient de importantă dacă populațiile unei specii manifestă grade diferite de adaptare la acțiunea distructivă a potențialilor factori stresori; reacția celor mai bine adaptate va implica o creştere a stabilității structurale şi implicit o scădere a asimetriei fluctuante. Aceasta din urmă se manifestă mai puternic în mediile mai puțin afectate de stres, care prezintă, din acest punct de vedere, o permisivitate crescută. O altă explicație a acestui fenomen ar fi cea expusă de Hochwender şi Fritz (1999), precum şi de Martel şi colaboratori (1999) care au studiat asimetria fluctuantă la salcie şi la mesteacăn, în diverse condiții de stres biotic sau abiotic: asimetria fluctuantă creşte în condiții optime de dezvoltare a indivizilor, deoarece o creştere accelerată a limbului foliar (care are loc în astfel de condiții) reprezintă în acelaşi timp un factor de instabilitate. Møller şi Eriksson (1994) sugerează că frunzele cu dimensiuni mai mari şi cu o creştere mai rapidă au o tendință mai puternică spre asimetrie decât frunzele mici, cu o rată de creştere mai scăzută.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Modificările în morfogeneza foliară determinate de factorii de mediu pot fi acompaniate de o creştere a costurilor fiziologice şi, în consecință, de creşterea asimetriei fluctuante (însuşi consumul energetic necesar unei creşteri accelerate poate fi considerat un factor de stres McKenzie şi Clarke, 1988). Din toate aceste observații se desprinde concluzia că asimetria fluctuantă, ca răspuns la modificarea condițiilor de mediu, depinde destul de mult de condițiile în care cresc plantele. Pentru a obține un răspuns real în ceea ce priveşte calitatea unui habitat folosind acest parametru (FA) analizele trebuie repetate la anumite intervale de timp. În acest studiu, plantele din zonele poluate sunt mai simetrice decât cele din zonele nepoluate. *Plantago major* este o specie cu o largă răspândire în arii cu o diversitate ecologică crescută; de aceea, poate fi considerată un indicator al calității habitatului.

Cornelissen şi Stiling (2005) au efectuat un studiu privind susceptibilitatea plantelor la atacul insectelor ierbivore. Speciile luate în studiu au fost *Quercus laevis* şi *Q. geminata*. Pentru aceste specii a fost determinată asimetria fluctuantă în paralel cu gradul de afectare de către insectele miniere. La ambele specii s-a determinat conținutul total de tanin din frunze, care a fost mult mai scăzut la frunzele asimetrice decât la cele simetrice, precum şi azotul total care a înregistrat o variație în sens invers. La frunzele asimetrice s-a observat o creştere a atacului acestor insecte comparativ cu cele simetrice. Studii asemănătoare au realizat şi Cowart şi Graham (1999), Freeman şi colab. (2005).

Hodar (2002) publică un studiu în care analizează asimetria fluctuantă legată de condițiile climatice la *Quercus ilex*. Rezultatele au

BCU MS / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

arătat o scădere a FA la plantele din zone mai secetoase față de cele din regiunile umede. Apariția precipitațiilor în zonele secetoase nu este urmată de o creştere a FA. Există două ipoteze ce ar putea explica acest mod de răspuns: prima se referă la o adaptare genetică care se realizează în timp; plantele din zonele supuse cronic la stresul lipsei de apă au un genotip adaptat acestor condiții şi sunt mult mai simetrice. Faptul că această trăsătură este determinată genetic explică şi lipsa de răspuns (în sensul creşterii FA) atunci când apar perioade cu precipitații crescute. Condițiile stresante de mediu acționează ca un catalizator al procesului evolutiv, selectând genotipurile cât mai bine adaptate (şi, implicit, mai simetrice) în defavoarea celor mai slab adaptate (care prezintă o asimetrie crescută). O altă ipoteză este aceea că plantele, odată cu creşterea în vârstă, prezintă un grad mai mare de simetrie (Roy şi Stanton, 1999). Posibilitatea adaptării populațiilor locale la stres este în favoarea utilizării FA ca un indicator al calității habitatelor. Dacă acest proces este determinat genetic, înseamnă că este posibilă selectarea indivizilor cu un grad de simetrie ridicat şi crearea unor linii rezistente la diverşi factori de mediu. Experimentele făcute de Roy şi Stanton la muştar au arătat însă că supunerea plantelor la stres duce inițial la o creştere a FA, ceea ce sugerează că acest parametru nu este utilizabil în procesele de selecție. Adaptarea care apare în ecosistemele naturale este de regulă legată de un stres cronic.

Poluarea afectează nu numai gradul de simetrie al unei plante, ci şi ritmul ei de creştere. Elkarmi şi Eideh, în 2006, publică un studiu referitor la modificările ce au loc la *Urtica urens* sub influența agenților poluanți, în ceea ce priveşte dimensiunile generale ale plantei, lungimea tulpinii,

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

lungimea rădăcinilor, suprafaţa foliară, lungimea peţiolului, greutatea uscată totală a plantei. Zona analizată, situată în apropierea unei rafinării de petrol, prezenta o concentraţie crescută a oxizilor de sulf şi monoxidului de carbon în aer. Plantele investigate au avut o creştere mai bună în zonele nepoluate, o lungime mai mare a tulpinii, a rădăcinii, a peţiolului şi a substanţei uscate. Pe de altă parte, plantele din zonele poluate au prezentat valori mai mari ale suprafeţei foliare, lungimii şi lăţimii frunzelor. Acest tip de relaţie indică faptul că poluarea a afectat această specie în două direcţii: prin creşterea suprafeţei foliare concomitent cu scăderea lungimii totale a plantei, a lungimii tulpinii, rădăcinii precum şi a cantităţii de substanţă uscată. Rezultate similare, constând în reducerea ratei generale de creştere a plantelor sub influenta diferiţilor factori poluanţi, au mai obţinut Deepak şi Agrawal (2001), Musika şi colab. (2004).

Într-un studiu recent (Gostin, 2007) a fost urmărită influenţa poluanţilor atmosferici dintr-o zonă antropizată în care, pe lângă factorii curenţi de poluare (inclusiv traficul auto intens) există şi o fabrică de ciment. Pentru investigaţii a fost utilizat ghizdeiul *Lotus corniculatus* deoarece este o specie comună în zonă şi poate fi găsită in zone cu diverse grade de poluare. Au fost urmărite lungimea totală a plantei, lungimea medie a internodurilor, lungimea si lăţimea foliolelor frunzelor compuse. De asemenea, au fost investigate structura frunzei şi a tulpinii.

Materialul vegetal, reprezentat de planta întreagă de *Lotus corniculatus* a fost colectat din Parcul Naţional Ceahlău şi din zonele adiacente. Varianta control (M) a fost prelevată din zona protejată a parcului, unde impactul poluării este foarte redus, iar variantele din satul

BCU IAŞI (CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY)

Taşca (V1) (în apropierea fabricii de ciment), gara Taşca (V2) şi staţia de încărcare a fabricii de ciment (V3).

Din fiecare locaţie au fost colectate 10 plante. Pentru a reduce erorile măsurătorilor, fiecare dimensiune (legat de lăţimea foliolelor, respectiv jumătatea dreaptă şi stângă a acestora) a fost măsurată de două ori, în două sesiuni diferite. De asemenea, măsurătorile au fost realizate de aceeaşi persoană.

Parametrul morfologic (cm)	M	V1	V2	V3
Lungimea totală a plantei (media)	45,4	45,7	38,5	43,4
Lungimea internodurilor (media)	3,52	1,39	2,67	2,89
Lungimea foliolei (media)	1,45	0,75	0,67	0,78
Lăţimea foliolei (media)	1,12	0,39	0,23	0,28
Lăţimea foliolei (partea stângă) (media)	0,56	0,195	0,115	0,143
Lăţimea foliolei (partea dreaptă) (media)	0,58	0,193	0,117	0,144
Raportul dintre partea stângă şi cea dreaptă	1,035	0,989	1,017	1,006

Tabelul 2 – Rezultatele măsurătorilor unor parametri morfologici ai organelor vegetative aeriene de la *Lotus corniculatus* (din zone cu grade diferite de poluare).

Rezultatele măsurătorilor pentru diferiţi parametri morfologici la probele martor şi control recoltate din zone cu grade diferite de poluare sunt prezentate în tabelul 2.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Lungimea totală a plantelor analizate nu a prezentat variații semnificative între proba control şi variantele V1 - V3. Plantele din loturile M si V1 sunt mai lungi (45,4 respectiv 45,7 cm) decât cele din loturile V2 şi V3. Lungimea internodurilor este vizibil mai mare la plantele din lotul martor (3,52 cm) şi scade în special la plantele din lotul V1. Acest parametru rămâne mai redus şi la plantele din lotul V2 respectiv V3. Acelaşi tip de variație prezintă şi dimensiunile (lungime, lățime) foliolelor (acestea au valori mai mari la plantele-control şi scad vizibil la plantele din loturile V1-V3). Raportul dintre jumătatea dreaptă si cea stângă a foliolelor evidențiază o asimetrie crescută a foliolelor la plantele-martor. La cele din loturile V1 – V3 gradul de simetrie este mai ridicat.

Posibilitatea de a estima efectele stresului ambiental asupra organismelor vii este îngreunată deoarece acestea sunt supuse unei game largi de factori necontrolabili (condițiile meteo, paraziții, amestecuri complexe de poluanți) (Velickovic şi Perisic, 2006).

Dimensiunile plantelor scad la exemplarele din zonele poluate V1-V3, dar gradul de simetrie creşte la acestea. Simetria foliară este pozitiv asociată cu stresul ambiental şi cu poluarea atmosferică (Kozlov si colab., 1996). Moller si Swaddle (1997) sugerează că poluarea atmosferică poate afecta la diferite niveluri însuşi procesul evolutiv.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

V. 2. Markeri structurali şi ultrastructurali

Emisia de poluanți atmosferici (rezultată în urma activității industriale, domestice sau sociale) poate crea probleme organismelor vegetale datorită gazelor toxice cu care acestea vin în contact. Acțiunea diverşilor poluanți atmosferici asupra plantelor a fost investigată de numeroşi cercetători (Patel şi Devi 1984, Ormrod et al 1981, Da Silva et al., 2005, Ahmad et al., 2005 s.a). La nivel ultrastructural apar numeroase modificări la nivelul aparatului vegetativ şi de reproducere. Acestea însoțesc modificările morfologice cum ar fi clorozele şi necrozele adiacente şi constau în distrugerea pigmenților clorofilieni, degenerarea tilacoizilor şi liza plastidelor (Lendzian şi Unsworth 1983, Psaras şi Christodoulakis 1987).

Efectul ploilor acide asupra plantelor se manifestă prin reducerea sau intensificarea creşterii şi dezvoltării, inhibarea germinării semințelor şi a fixării azotului la plantele din familia *Fabaceae,* distrugerea unor constituenți ai cerii epicuticulare şi ai cuticulei, alterarea schimburilor de gaze, reducerea conținutului în clorofila a şi b, precum şi a ratei fotosintezei, apariția de cloroze şi necroze la nivelul aparatului foliar şi intoxicarea celulelor ca urmare a dereglării activității enzimatice (Kozlowski, 1980; Evans, 1984; Percy, 1986; Singh şi Agrawal, 1996; Fan şi Wang, 2000; Velikova et al., 2000; Singh et al., 2004). Dacă poluanții gazoşi pătrund în plante prin ostiolele stomatelor, componentele ploii acide penetrează frunzele prin cuticulă (Kertiens, 1994). Ploaia acidă poate modifica structura cerii epicuticulare şi a altor caracteristici ale suprafeței foliare, influențând astfel aderența apei la suprafața frunzei şi pătrunderea apei de ploaie în țesuturile acesteia. Tipul de ceară epicuticulară, arhitectura suprafeței cuticulare, tipul de peri tectori, forma celulelor epidermice

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

constituie caracteristici ale frunzei care sunt în strânsă legătură cu sensibilitatea diverselor specii de plante la poluarea atmosferică. Anatomia frunzei şi caracteristicile micromorfologice ale plantei sunt de asemenea trăsături importante pe baza cărora se poate stabili gradul de sensibilitate la agenții poluanți.

Metalele grele sunt cunoscute ca fiind foarte puțin mobile, ceea ce înseamnă că, odată ajunse într-un ecosistem, se elimină extrem de greu din acesta. O parte sunt absorbite de către plante prin intermediul rădăcinilor şi se acumulează în țesuturile lor, fiind preluate prin consum de către animalele ierbivore, iar ulterior de către cele carnivore. Datorită slabei lor mobilități, metalele grele se concentrează la nivelul fiecărui nivel trofic, respectiv concentrația lor în plante este mai mare decât în sol, în animalele ierbivore mai mare decât în plante, în țesuturile carnivorelor mai mare decât la ierbivore, concentrația cea mai mare fiind atinsă la capetele lanțurilor trofice, respectiv la răpitorii de vârf şi implicit la om. Acest fenomen poartă denumirea de bioacumulare şi, din acest motiv, la nivelul grupelor amintite, concentrațiile ridicate de metale grele pot determina afecțiuni grave care duc la mortalități importante, generând tulburări la nivelul ecosistemelor.

Plantele superioare acționează ca biomonitori pentru metalele grele, datorită capacitații lor de a le acumula la nivelul aparatului foliar. Acestea nu numai că interceptează metalele grele din atmosferă, ci le şi acumulează pe cele din sol. Metalele grele care ajung din aer în sol sunt preluate de plante prin intermediul sistemului lor radicular şi apoi translocate în alte organe vegetative (Shparyk şi Parpan, 1990). Modul în care particulele care se depozitează pe suprafața frunzelor poate fi

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

influențat de numeroşi factori cum ar fi masa şi dimensiunile particulei, viteza vântului în zonă, caracteristicile micromorfologice ale suprafeței foliare (Bache et al., 1991). Depozitele de microparticule pot fi spălate de ploaie şi translocate în sol sau pot fi reținute de frunzele plantelor.

Unele metale cum ar fi Ag, Au, Hg, Pb sunt foarte toxice pentru plante, toxicitatea lor manifestându-se şi la concentrații mici. Altele, precum Cu, Zn, Fe sunt microelemente, esențiale pentru ca metabolismul secundar să se desfăşoare în condiții normale. Cr şi Pb nu sunt esențiale, însă sunt toxice pentru celulele plantelor (Panda et al., 2003). Cromul există în natură sub forma Cr III şi Cr VI, forma hexavalentă fiind mai toxică decât cea trivalentă. Cromul intră în componența multor pigmenți şi aceasta este sursa potențială de poluare în natură. Efectele negative pe care le are asupra plantelor se manifestă prin apariția de cloroze, reducerea creşterii, inhibarea germinării, degradarea pigmenților, inducerea stresului oxidativ (Barcelo şi Poschenrieder, 1996). Atât cromul, cât şi plumbul pot cauza modificări ale cloroplastelor în celulele asimilatoare (Choudhury şi Panda, 2005).

Determinarea cantității de metale grele din plante oferă date concrete despre acumularea acestora la nivelul organismului vegetal; efectele lor asupra metabolismului sunt diferite, funcție de gradul de sensibilitate al fiecărei specii. Pentru a verifica semnificația pe care o anumită cantitate de metale grele o are față de o specie dată este indicat să se efectueze determinări ale conținutului de polifenoli din organele vegetative. Fenolii pot fi utilizați ca biomarkeri ai poluării, deoarece participă la reacția de răspuns a plantelor care acumulează metale grele, acționând ca antioxidanți capabili să neutralizeze radicalii liberi produşi de acestea.

BCU IAŞI (CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Frunzele plantelor ce cresc în zone contaminate cu metale grele conțin cantități de fenoli mult mai crescute decât frunzele celor din zone neafectate de poluare. Ei pot fi utilizați ca indicatori ai poluării în stadii precoce, înainte de a fi vizibile modificări morfologice, structurale sau chiar ultrastructurale. Pentru a studia la nivel celular rolul polifenolilor în cazul plantelor ce acumulează metale grele se efectuează un tip special de fixare ce combină glutaraldehida cu cafeina pentru a precipita aceşti compuşi în celule. Astfel, ei apar la microscopul electronic cu transmisie (TEM) ca fiind electrono-denşi, opaci.

Deoarece compuşii secundari de metabolism joacă un rol semnificativ în cadrul interacțiunilor ce au loc într-un ecosistem, trebuie luat în considerare rolul diferiților factori de stres care influențează cantitatea şi compoziția lor deoarece modificările se propagă inevitabil şi la alte specii din lanțul trofic (Loponen et al., 2001). Produşii secundari de metabolism au localizări precise în compartimente la nivel subcelular, acestea fiind legate de proprietățile lor chimice, precum şi de rolul jucat în fiziologia plantei. Glicozidele fenolilor sunt localizate în medii hidrofile, cum ar fi vacuolele şi apoplastul, în timp ce agliconii se regăsesc în regiuni lipofile (Sakihama et al., 2002). Alți compuşi fenolici solubili pot fi localizați în citoplasmă sau chiar în nucleu (Stefanowska et al., 2002). Deoarece distribuția şi acumularea produşilor secundari de metabolism în celule este condiționată uneori şi de factorii de mediu, localizarea fenolilor în cazul celulelor expuse poluării cu metale grele depinde de modificările pe care acestea le induc la nivel ultrastructural (Santiago et al., 2000). De exemplu, compartimentarea şi formarea complexelor cu derivați fenolici în vacuole poate reprezenta o

BCU INSTITUTUL CENTRAL UNIVERSITAR

modalitate de manifestare a rezistenței unor specii la poluarea cu metale grele (Larcher, 1995, Tong et al., 2004).

Numeroase studii efectuate pe diferite specii de plante au arătat grade diferite de afectare ale acestora, ca urmare a supunerii la acțiunea poluanților atmosferici, şi, deci, nivele diferite de sensibilitate.

V. 2. 1. Studii de caz – observații în mediul natural

Studiile comparative efectuate asupra frunzelor de *Laurus nobilis* provenind din zone poluate ale Atenei şi dintr-un areal muntos învecinat neafectat au relevat modificări puțin semnificative la nivelul structurii şi ultrastructurii acestora. La ambele probe grosimea limbului este comparabilă, nefiind vizibile deosebiri din acest punct de vedere; cuticula groasă şi celulele epidermice impregnate cu tanin sunt trăsături specifice plantelor din zonele mediteraneene şi constituie o barieră de protecție contra deshidratării şi intensității crescute a radiației solare (Christodoulakis şi Mitrakos, 1987). Grosimea mai mare a peretelui extern al celulelor epidermice la plantele expuse poluării poate reprezenta un indicator al creşterii gradului de xerofitism al acestora. La toate speciile de plante sempervirente stomatele apar cantonate numai la nivelul epidermei inferioare (limb hipostomatic). În celulele asimilatoare din țesutul palisadic au fost observate numeroase cloroplaste cu granule mici de amidon tranzitoriu. Celulele din mezofil ce acumulează polifenoli sunt prezente şi la plantele din zona nepoluată, însă sunt vizibil mai numeroase în frunzele plantelor din zonele afectate de poluare (fig. 22). Dimpotrivă, acumulările de uleiuri esențiale sunt mai importante în frunzele plantelor din zona

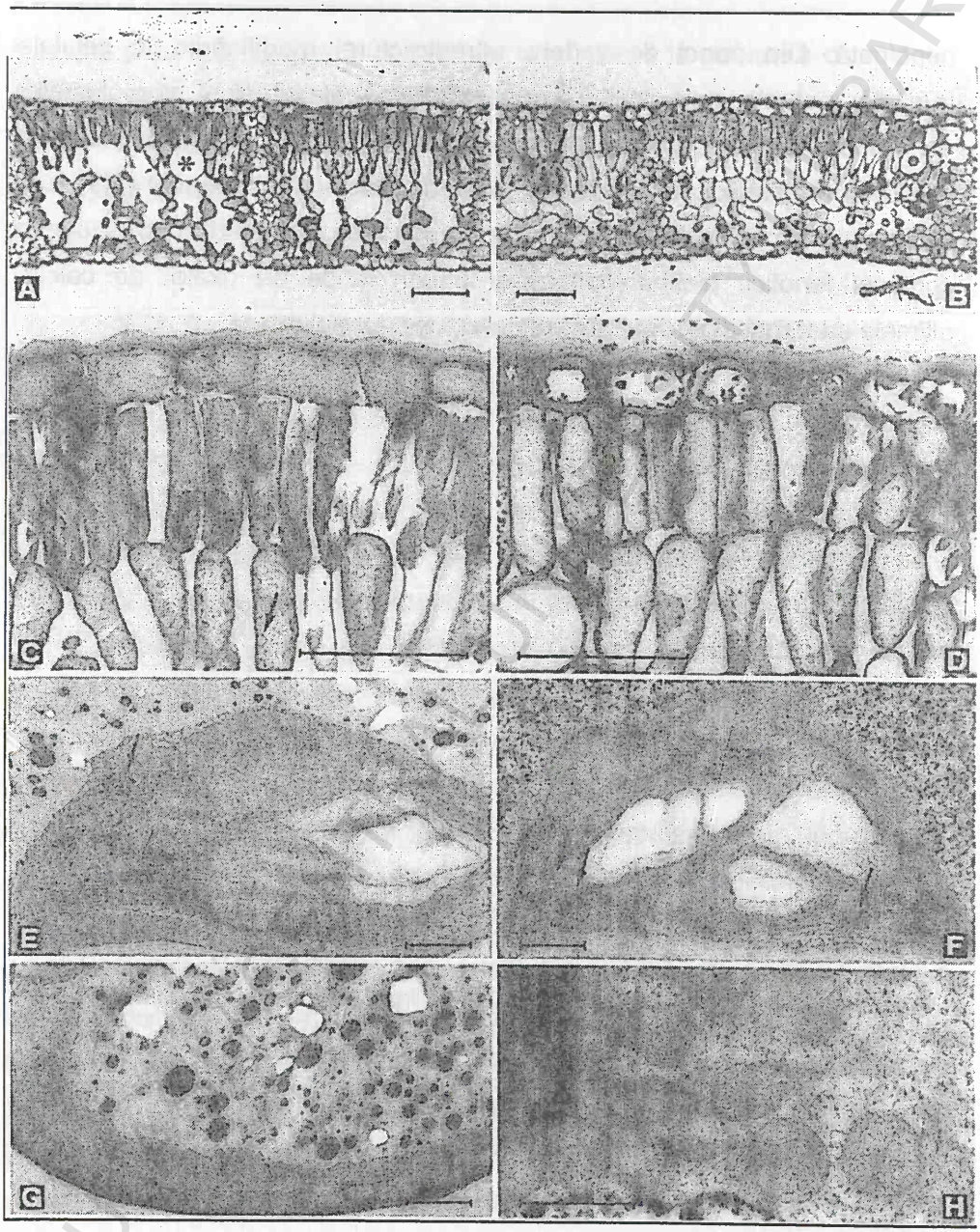
BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

nepoluată. Din punct de vedere ultrastructural modificările în celulele frunzelor poluate sunt relativ reduse. Sistemul tilakoidal al cloroplastelor este bine dezvoltat, granele sunt normal configurate; în ambele cazuri la nivelul cloroplastelor sunt prezente picături lipidice (plastoglobuli) şi granule mici de amidon. În celulele asimilatoare vacuolele sunt foarte mari şi conţin compuşi fenolici, picături lipidice şi uneori rafide de oxalat de calciu; ultimele sunt mai abundente în celulele frunzelor poluate.

Figura 22 A - Secţiune transversală printr-o frunză de *Laurus nobilis* dintr-o zonă nepoluată; asteriscul marchează o celulă cu uleiuri esenţiale (idioblastă); B – Secţiune transversală printr-o frunză dintr-o zonă poluată; săgeata indică celule cu depozite de tanin; C, D - Ţesutul palisadic la o frunză din zona nepoluată (C) şi din zona poluată (D); săgeţile indică cloroplastele; scara = 100 µm; E, F – Aspecte electrono-microscopice ale cloroplastelor din ţesutul palisadic al unei frunze din zona nepoluată (E) şi din cea poluată (F); G – Picături lipidice şi cristale simple în frunza unei plante din zona poluată; H – Mitocondrii din celule ale unei frunze poluate; scara = 1 µm (Christodoulakis şi Mitrakos, 1987).

⇨

BCU IASI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY


A
B
C
D
E
F
G
H

Mitocondriile şi microsomii nu prezintă modificări ultrastructurale; în unele cazuri apar modificări ale membranei celulare, dar acestea par a fi mai degrabă asociate cu depunerile de fenoli prezente în ambele tipuri de probe.

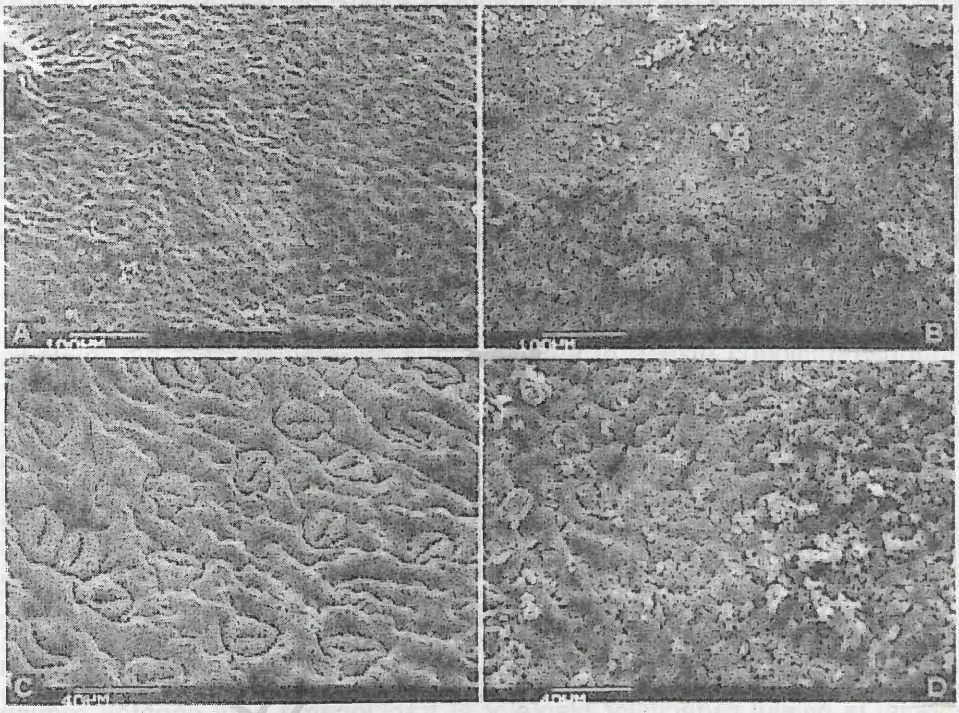


Figura 23 - Epiderma superioară a unei frunze de *Laurus nobilis* nepoluate (A) şi a uneia poluate (B). Epiderma inferioară a unei frunze nepoluate (C) şi a uneia poluate (D); săgeţile indică stomatele acoperite de microparticule, (Christodoulakis şi Mitrakos, 1987).

Investigaţiile efectuate la microscopul electronic cu baleiaj au evidenţiat prezenţa unor cruste pe suprafaţa frunzelor provenite din zonele

poluate. Atât epiderma superioară, cât şi cea inferioară sunt afectate, iar stomatele se disting cu greutate printre aglomerările de particule străine (fig. 23).

Deşi poluarea afectează destul de intens aceste frunze, dovadă fiind depunerile masive de pe suprafeţele foliare, a fost observată doar o uşoară creştere a gradului de xeromorfism la plantele poluate, modificări semnificative la nivel ultrastructural nefiind observate. Prezenţa granulelor de amidon la nivelul cloroplastelor sugerează că nici productivitatea nu este major afectată, procesul de fotosinteză desfăşurându-se normal. Pe baza acestor observaţii autorii clasifică specia investigată ca fiind extrem de tolerantă la acţiunea poluanţilor atmosferici, toleranţa ei putând fi conferită, într-o anumită măsură, de caracterul ei xerofitic nativ.

Investigaţii recente efectuate de Bialonska şi colaboratorii (2007), legate de efectele poluării cu zinc şi plumb asupra frunzelor de afin (*Vacccinium myrtillus*), arată modificări importante atât la nivel ultrastructural, cât şi biochimic. Plantele colectate din zonele poluate conţineau cantităţi crescute de zinc (ce depăşeau de 2,98 ori nivelul toxic) şi cantităţi scăzute de plumb (sub nivelul toxic), deşi acesta era prezent în mediul înconjurător. O posibilă explicaţie este acumularea plumbului în special la nivelul rădăcinilor plantelor şi translocarea unei cantităţi reduse din acest metal către frunze (Jarvis şi Leung, 2001). Per ansamblu însă, concentraţiile de metale grele din frunzele de afin recoltate dintr-o zonă poluată au fost considerabil mai mari decât cele ce se regăseau în frunzele plantelor din zona-martor (tabelul 3).

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Element	zona-martor (nepoluată)	zona poluată	nivel toxic
Pb	0.36±0.08	8.93±2.03	30–300
Cd	0.70±0.14	3.20±0.47	5–30
Zn	35±6	298±53	100–400
Cu	8.4±1.9	8.7±1.6	20–100
Ni	1.84±0.09	1.96±0.21	10–100
Fe	153±12	302±44	–

Tabelul 3 – Concentrațiile de metale grele în frunzele de afin (*Vaccinium myrtillus*) colectate dintr-o zonă poluată şi una martor. Nivelul toxic este în acord cu datele furnizate de Kabata-Pendinas (2001) pentru plante cu sensibilitate şi toleranță medie (Bialonska et al., 2007).

Cu toate acestea, nivelul de metale grele este crescut în frunzele plantelor din zona poluată, iar supraviețuirea în aceste condiții presupune ca acestea să dezvolte mecanisme evoluate de protecție. Cantitatea de fenoli din frunzele poluate o depăşeşte pe cea din frunzele martor cu 80 - 90%, acesta fiind un răspuns metabolic al plantelor la poluarea cu zinc, cadmiu şi plumb, ce le oferă o protecție împotriva efectelor toxice. În mod natural frunzele de afin reprezintă o sursă biologică de fenoli, incluzând acidul cafeic, vanilic, quercetina, kemferolul, acidul clorogenic, acidul p-cumarinic, arbutina (Witzell şi Shevtsova, 2004). Compuşii fenolici acționează ca antioxidanți, substanțe antimicrobiene şi reduc în acelaşi timp gradul de consum al frunzelor de către animalele ierbivore. Atacul unor ciuperci parazite creşte semnificativ nivelul de cvercetin-glicozidă şi acid p-cumarinic în frunzele de afin. Creşterea concentrației compuşilor fenolici ca urmare a prezenței metalelor grele în cantități mari în mediul înconjurător poate induce modificări în interacțiunile ecologice ale speciei

cu dușmanii ei naturali. Este interesant de observat că plantele manifestă reacții asemănătoare atât în cazul unui stres biotic (atacul unor paraziți), cât și în cazul unuia abiotic (poluarea cu metale grele), ambele având ca rezultat modificarea căilor de sinteză a metaboliților secundari și acumularea acestora în frunze.

Pe lângă proprietățile antioxidante, antimicrobiene și de reducere a consumului plantei de către ierbivore, polifenolii sunt implicați și în relațiile alelopatice față de alte plante sau față de microorganismele din sol (Witzell et al., 2003). De exemplu, substanțele cu proprietăți alelopatice extrase din frunzele de afin inhibă geminația semințelor și apoi creșterea plantulelor de molid. Acest fapt împiedică regenerarea pădurilor de conifere acolo unde populațiile de afin ocupă suprafețe considerabile. De asemenea, humusul care conține frunze de afin în descompunere inhibă și dezvoltarea unor ciuperci din genul *Hebeloma*, care realizează simbioze micoriziene cu unele specii de conifere, dar stimulează creșterea altei specii de ciupercă – *Hymenoscyphus ericae* – simbiont care colonizează rădăcinile de *Vaccinium myrtillus*. Concentrația mare de polifenoli din litieră favorizează această specie care câștiga competiția cu alte organisme micorizante, în detrimentul speciilor de plante superioare care, astfel, nu mai intră în competiție cu afinul (Souto et al., 2000). Acest efect pare a fi foarte important, deoarece rezistența afinului, care poate crește în soluri foarte acide și poluate cu metale grele se datorează tocmai capacității de a forma micorize.

Din punct de vedere ultrastructural, celulele din mezofilul frunzelor colectate din zone nepoluate prezintă numeroase cloroplaste, cu grane bine definite, cu granule de amidon și cu numeroși plastoglobuli, electrono-

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

denşi. Celulele au vacuole de dimensiuni medii, citoplasma fiind foarte bogată, iar organitele celulare mari (figura 24). În citoplasmă se observă, de asemenea, structuri electrono-dense (corpi osmiofili).

Celulele asimilatoare din frunzele plantelor ce provin din zona poluată prezintă grade diferite de dezorganizare. În fig. 25 se pot observa cloroplaste mari, cu granule de amidon, dar citoplasma prezintă semne de degenerare timpurie reprezentate de prezența formațiunilor multiveziculare, pline cu material de densități diferite; cel electono-transparent este reprezentat de picături lipidice, iar cel electrono-dens, probabil de natură polifenolică, se continuă şi în lungul pereților celulari. La aceste celule vacuola centrală este foarte mare, citoplasma fiind împinsă în poziție parietală; de aceea forma cloroplastelor apare lenticulară, spre deosebire de cele din frunzele plantelor din zone nepoluate, care sunt ovoidale spre sferice. Vacuolele sunt pline cu materiale cu densități diferite; de regulă vacuolele centrale, mari, sunt pline cu material electrono-dens (V***), iar cele mai mici, incluse în cele mari, au material cu densitate scăzută (V**) sau sunt chiar electrono-transparente (V*) (Fig.25 b).Toate aceste tipuri de vacuole sunt separate de membrane intacte şi nu fuzionează între ele, menținându-şi funcțiile diferite, conferite de conținutul lor chimic distinct. Materialele electrono-dense pot proveni din degenerarea unor vezicule, ele observându-se şi în spațiile intercelulare. Aceste depozite sunt prezente şi în apropierea pereților celulari şi chiar în interiorul acestora (Fig. 25 c).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

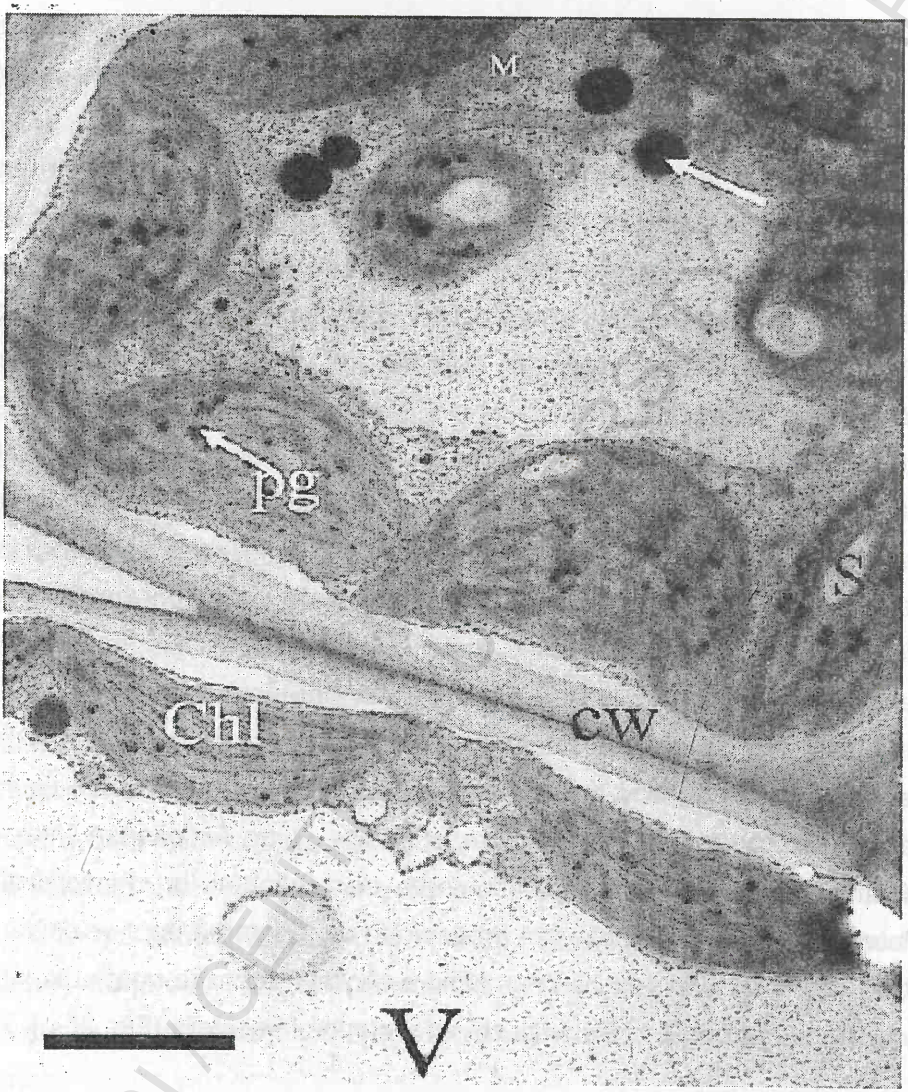


Figura 24 - Ultrastructura celulelor asimilatoare din frunzele de afin (*Vaccinium myrtillus)* colectate din zone nepoluate: V – vacuola centrală, Chl – cloroplast, S – granulă de amidon, pg – plastoglobuli, cw – perete celular (Bialonska et al., 2007).

În unele cazuri se pot observa stadiile finale ale degenerescentei celulare în mezofilul frunzelor provenite din zonele poluate (Fig. 25 d, 26). În centrul celulei pot fi observate cloroplaste cu sistemul membranar şi tilakoidal vizibil dezintegrat. Se observă, de asemenea, picături lipidice dispersate în vezicule şi răspândite în conținutul citoplasmatic degenerat. Depozite de material electrono-dens se observă şi în lungul lamelei mediane; de asemenea, ele sunt vizibile şi în lungul pereților celulari.

Localizarea histochimică a fenolilor prin tratarea probelor cu cafeină poate fi observată şi în celulele frunzelor plantelor recoltate din zonele nepoluate. Aceste structuri reflectă acumularea naturală de polifenoli, în special de flavone, caracteristică pentru această specie. Precipitarea polifenolilor conferă un aspect general electrono-dens mult mai intens frunzelor plantelor din zonele poluate, ceea ce denotă faptul că aceştia sunt produşi în cantități mult mai mari decât în condiții normale. Distribuția polifenolilor în celulă poate fi legată de localizarea metalelor grele la nivel subcelular. Agregatele electrono-dense au fost observate în apropierea anvelopei plastidiale, precum şi în vecinătatea altor sisteme membranare (veziculele citoplasmatice şi tonoplastul). Numeroase depozite, reduse ca dimensiuni, de polifenoli se observă şi în grosimea peretelui celular. Localizarea lor în proximitatea membranelor celulare este în concordanță cu siturile cunoscute ca fiind implicate în biosinteza lor (Dixon şi Paiva, 1995). Acumularea polifenolilor în vacuole precum şi în apoplast joacă un rol important în neutralizarea radicalilor liberi produşi de celulele vegetale. De exemplu, flavonoidele situate în apropierea membranei previn oxidarea

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

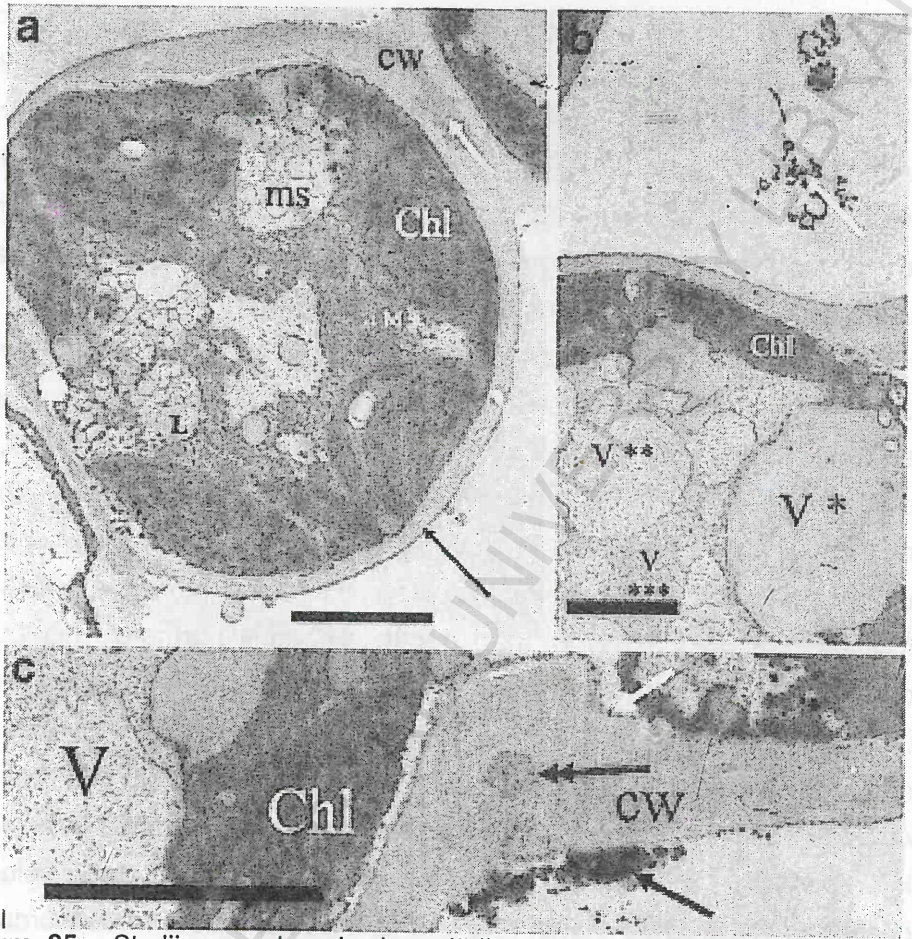


Figura 25 - Stadii succesive ale degradării celulelor asimilatoare din mezofilul frunzelor de afin (*Vaccinium myrtillus*) recoltate din zone afectate de poluare (cu Pb-Zn); a - celule în stadiul inițial de afectare: ms – structuri multiveziculare, cw – perete celular, Chl – cloroplast, L – picături lipidice; b – Vacuolele, cu conținut electrono-dens (V***) sau electrono-transparent V**, V*) ocupă aproape tot volumul celular; săgeata indică compuşii electrono-denşi din spațiul intercelular; c – depozite electrono-dense în peretele celular şi în vecinătatea acestuia (Bialonska et al., 2007).

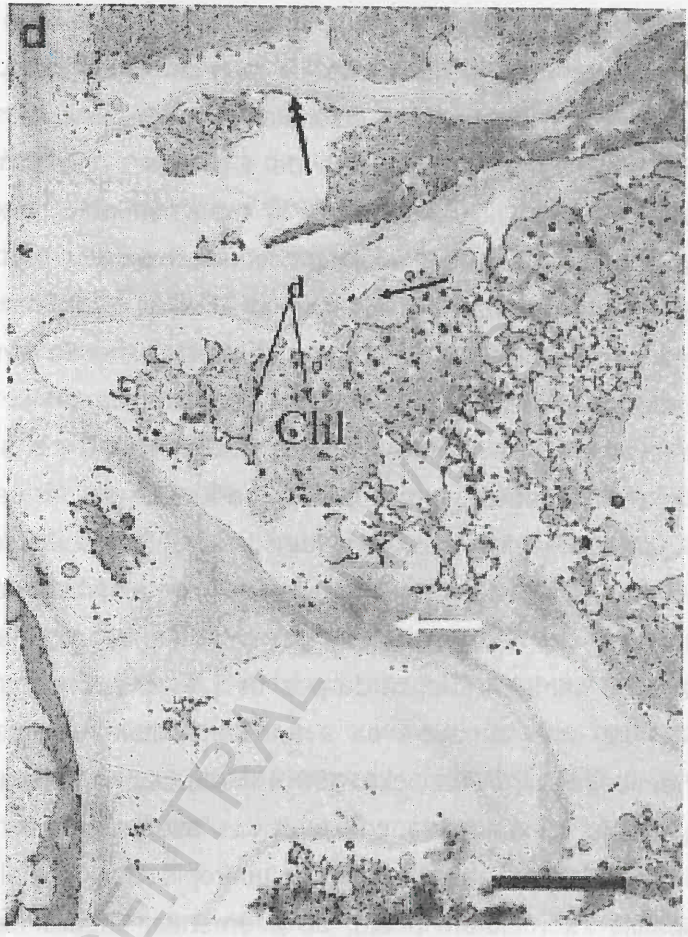


Figura 26 - Celulă degenerată din mezofilul frunzei de afin recoltată din zona poluată; se observă cloroplaste cu sistemul tilakoidal distrus şi cu depozite electrono-dense; incluziuni electrono-transparente (picături lipidice) se observă în aproape toată masa citoplasmatică a acestuia (Bialonska et al., 2007).

lipidelor când acestea sunt expuse acțiunii radicalilor de oxigen (Terao et al., 1994). Peretele celular reprezintă un compartiment responsabil de toleranța plantelor față de poluarea cu metale grele. Acumularea acestora la nivel parietal reprezintă o modalitate de a proteja plasmalema față de acțiunea toxică a metalelor grele şi de a menține, la un nivel scăzut, concentrația acestora la nivel citoplasmatic; însă, acumularea metalelor grele în perete poate afecta negativ funcționalitatea enzimelor din acest compartiment (Ernst, 1998). În cazul observațiilor de microscopie electronică efectuate pe frunzele de afin recoltate din zone poluate şi nepoluate depozitele apar atât la nivelul lamelei mediane cât şi la nivelul peretelui primar, în spatiile intercelulare sau aderente de partea internă a acestuia. Această localizare extrem de diversă poate fi corelată cu structura chimică a diferitelor compartimente parietale. Lamela mediană este în întregime de natură pectică; peretele primar conține celuloză, hemiceluloze şi o cantitate redusă de pectine (Jarvis şi Leung, 2001). De exemplu plumbul este cunoscut ca având o afinitate crescută față de pectine şi hemiceluloză (Wierzbicka, 1998). Materialul ce adera de partea internă a peretelui celular este constituit, de asemenea, din substanțe pectice, cum ar fi acidul galacturonic şi glucuronic. Depozitele de metale grele din spatiile intercelulare poate, de asemenea, sugera transferul lor apoplastic în cursul translocării ce are loc în corpul plantei.

Cercetările privind localizarea subcelulară a metalelor grele presupun utilizarea unor tehnici diferite de microscopie electronică. Tehnicile convenționale de fixare, deshidratare şi includere în răşini epoxidice sunt suficiente pentru a evidenția localizarea în celule a

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

plumbului, deoarece acesta nu este îndepărtat sau spălat în cursul proceselor de prelucrare (Jarvis şi Leung, 2001, Wierzbicka, 1998).

Spre deosebire de acesta, alte metale, cum ar fi zincul şi cadmiul, sunt îndepărtate în mare parte din celule atunci când se utilizează tehnicile convenționale (Heummann, 2002). Pentru localizarea acestora se utilizează o tehnică specială numită autometalografie; aceasta se bazează pe conversia ionilor metalici din țesuturi în metal-sulfizi care precipită şi rămân în celule. A fost astfel detectată prezența zincului în spațiile intercelulare, în pereții celulari, precum şi în interiorul vaselor de lemn de la *Armeria maritime*; puține celule acumulează zinc în vacuole,în timp ce în citoplasmă şi în alte organite celulare nu s-au găsit urme din acest metal (Heummann, 2002). Doar în celulele aflate în stadiu avansat de necroză depozitele de zinc au fost observate distribuite aleatoriu în tot volumul celular. Nu este clar încă dacă aceste degradări celulare se datorează acțiunii zincului în celule sau dacă acesta pătrunde prin difuziune în celulele deja afectate. Apariția veziculelor în spațiile celulare, vezicule rezultate în urma procesului de necroză, a fost observată şi de cercetători care au investigat efectele altor poluanți asupra plantelor (Soikkeli şi Karenlampi, 1984, Zobel şi Nighswander, 1990). Acest fapt sugerează că există mecanisme similare de apariție a necrozelor în cazul acțiunii unor variați factori de stres abiotic.

Studii privind modificările ultrastructurale ce apar la plantulele de fasole (*Phaseolus vulgaris*) după tratamentul cu metale grele (tecnetiu-99) în condiții de iluminare diferită au fost efectuate de Bennassar şi colaboratorii în 1991. Aceştia au arătat că, la lumină intensă, au fost afectate respirația, asimilația, conținutul de pigmenți, precum şi ritmul de

BCU CLUJ / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

creştere, însă fără a fi prezente modificări structurale de tipul clorozelor şi al necrozelor. Ele însă au fost prezente la plantele iradiate şi crescute în condiţii de iluminare scăzută. Investigaţiile realizate cu ajutorul microscopului electronic cu transmisie au arătat modificări la nivelul cloroplastelor, similare cu cele observate în cazul plantelor ce prezentau carenţe în molibden.

Tecnetiul este un metal greu radioactiv cu toxicitate pentru plante, chiar atunci când este prezent în concentraţii reduse; acesta inhibă respiraţia şi fotosinteza, determină apariţia în celule a unor proteine nefuncţionale deoarece se leagă de cisteină înainte ca ea să intre în structura primară a proteinelor. Prezenţa proteinelor nefuncţionale este implicată în apariţia de efecte citotoxice la plantele tratate cu acest metal greu. Însă intensitatea efectului toxic este condiţionată de intensitatea luminii la care sunt crescute plantele ce au fost supuse tratamentului.

La plantele crescute în condiţii de lumină redusă cloroplastele au prezentat modificări destul de importante (fig. 27); acestea erau umflate, cu zone electrono-transparente în stromă. Spoturi electrono-dense au fost observate în regiunea periferică a plastidelor; acestea diferă clar de plastoglobuli care au o formă regulată şi o densitate mai mare. Granele sunt mai puţine, stromatilacoizii prezintă o formă particulară, curbată, care nu se regăseşte la plantele netratate cu tecnetiu. Granulele de amidon tranzitoriu nu sunt vizibile, ceea ce indică o afectare masivă a procesului de asimilaţie clorofiliană la nivelul frunzei.

Unele cloroplaste prezintă expansiuni amoeboidale în vecinătatea vacuolelor, deseori asociate cu vezicule. În zonele necrozate cloroplaste

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

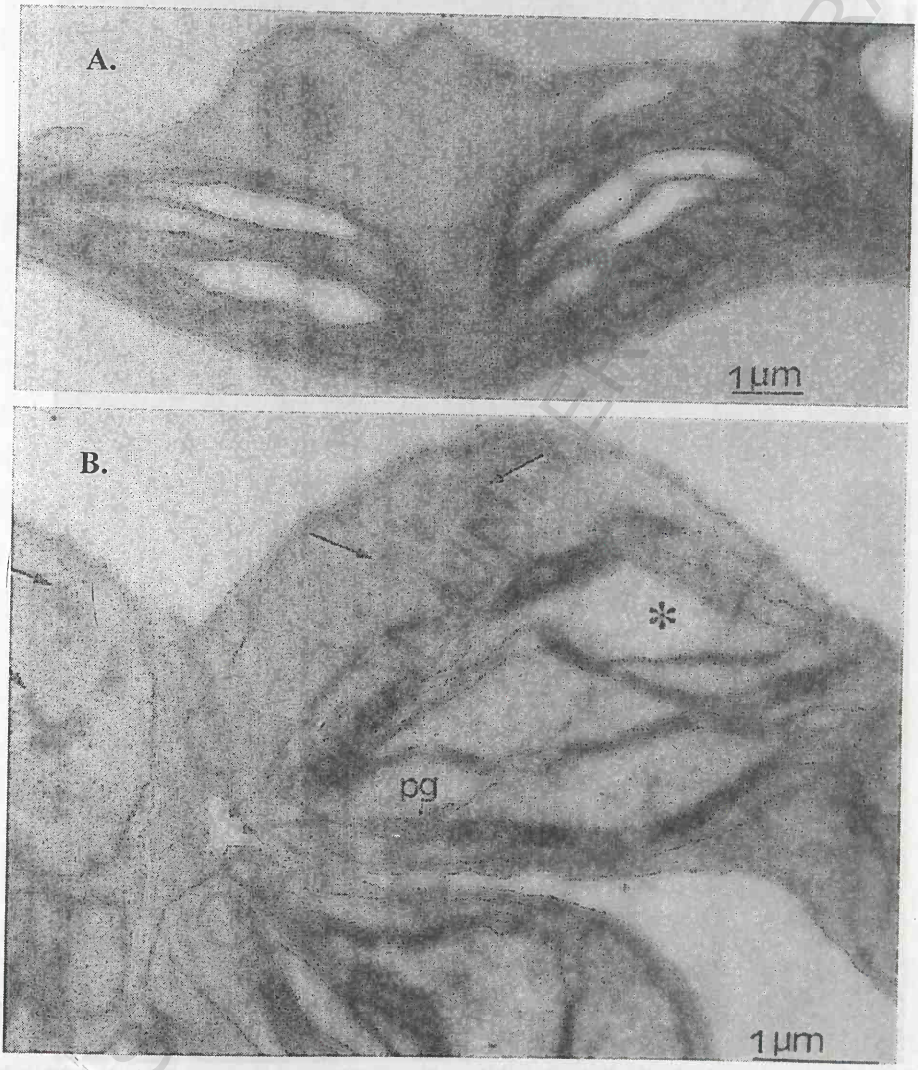


Figura 27 – A – cloroplast de la o plantă control de *Phaseolus vulgaris* crescută în condiții de iluminare slabă; B - cloroplast de la o plantă tratată cu tecnetiu 99 şi crescută în aceleaşi condiții (Bennassar et al., 1991).

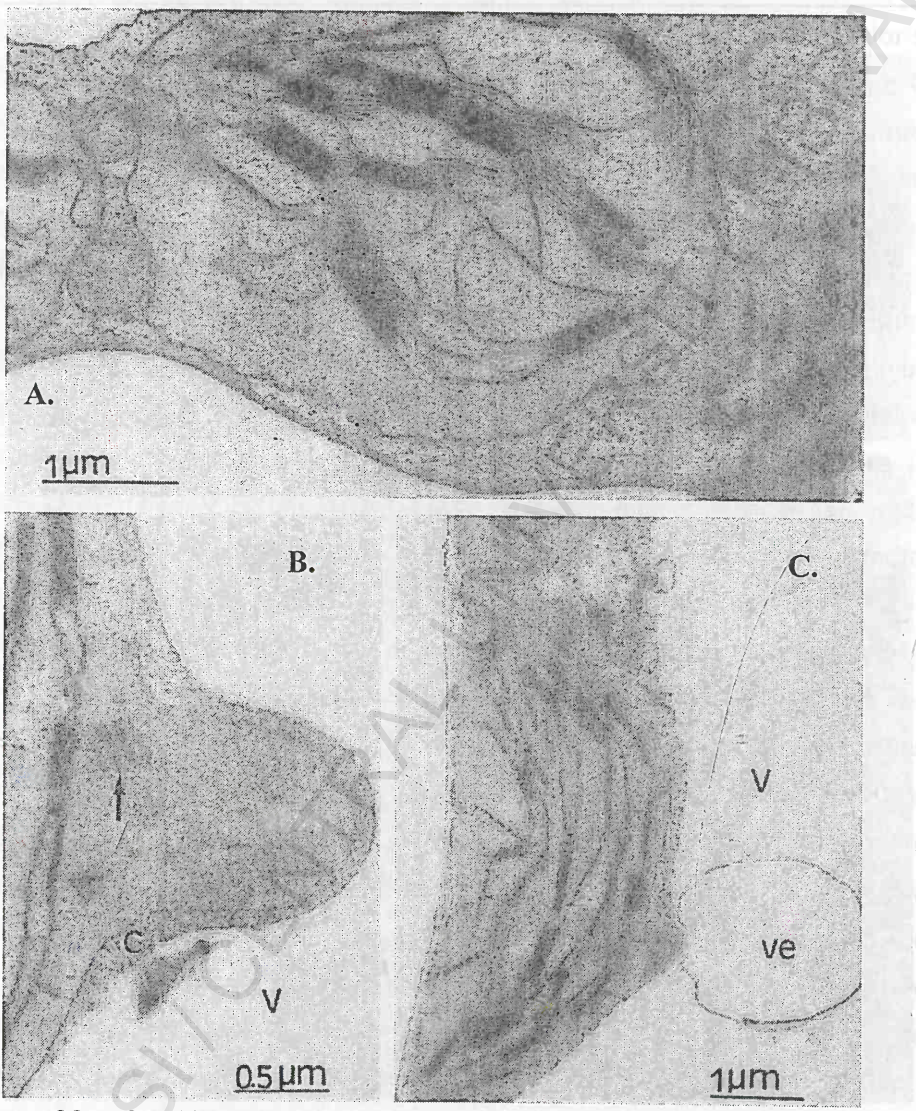


Figura 28 – A - Cloroplast de la o plantă tratată cu tecnetiu 99, crescută în condiții de lumină redusă, B – protuberanță amoeboidă a unui cloroplast; C – conexiune între o protuberanță a cloroplastului şi o veziculă vacuolară (Bennassar et al., 1991).

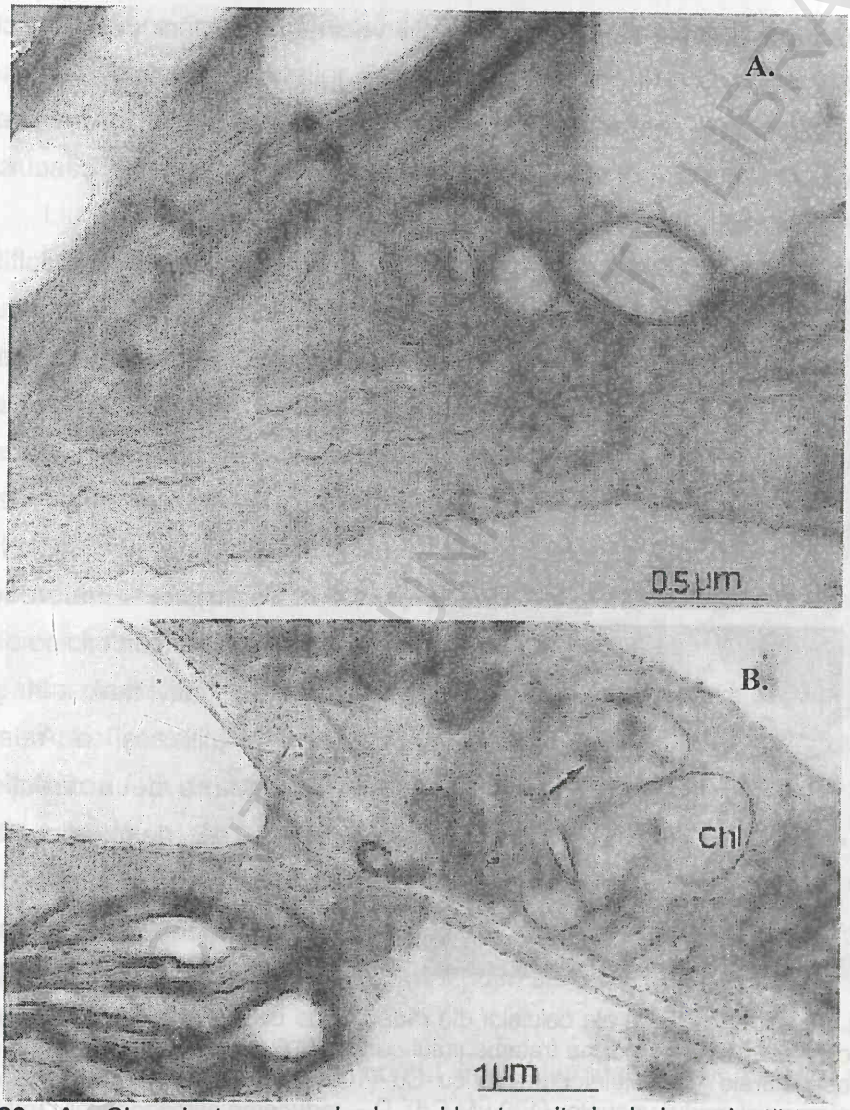
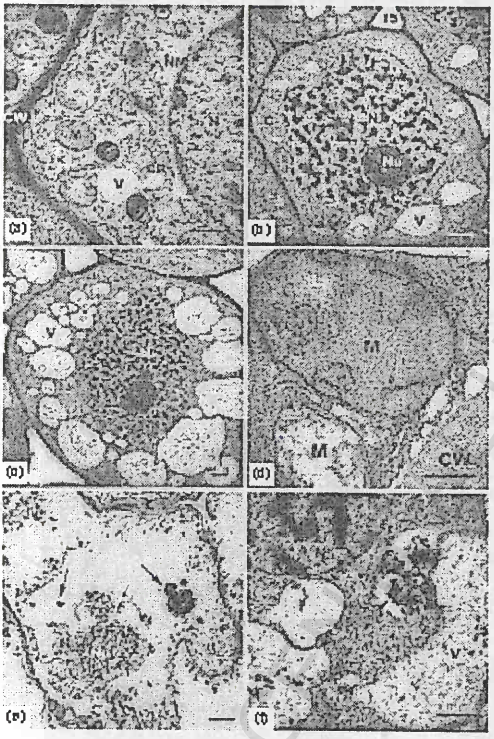


Fig. 29 - A - Cloroplast cu granule de amidon tranzitoriu de la o plantă tratată cu tecnetiu 99, crescută în condiții de lumină puternică, B – cloroplast dezorganizat la aceeaşi plantă, cu depozite de material electrono-dens (Bennassar et al., 1991).

aproape complet dezorganizate apar în vecinătatea unora cu o structură normală (fig. 29).

Răspunsul diferit al plantelor tratate cu tecnetiu în funcție de intensitatea luminii indică existenta unei toleranțe crescute în cazul celor care sunt ținute la lumină intensă.



Investigarea modului de influență a metalelor grele asupra plantelor trebuie realizată din două perspective distincte şi anume: cercetări efectuate în condiții concrete în teren, într-o zonă cunoscută ca fiind supusă poluării cu metale grele în vederea evidențierii modificărilor ce apar atât la nivel individual, cât şi la nivelul populațiilor şi al relațiilor dintre acestea; a doua direcție de investigație se desprinde ca o necesitate pentru validarea rezultatelor obținute în prima etapă.

Fig. 30 – Imagini TEM ale celulelor din rădăcina de usturoi (*Allium sativum*) ilustrând modificările ce apar în urma tratamentului cu Cd: A, B – celule martor, C-F – aspecte ultrastructurale ale celulelor tratate cu Cd (100 µM – 10 mM) – C – se observă creşterea volumului vacuolar (100 µM Cd), D – reducerea mitocondriilor (1mM Cd), E – se observă depuneri electrono-dense în vacuolă şi în nucleoli (10 mM Cd), F – vezicule cu conținut electrono-dens dispersate în vacuolă (1 mM Cd) (Liu şi Kottke, 2003).

Deoarece în mediul natural indivizii nu se pot sustrage niciodată acțiunii complexe a diverşilor factori naturali sau antropici, modificările observate în aceste condiții nu pot fi considerate ca fiind determinate unicauzal.

Liu şi Kottke (2003) au evidențiat, pe cale experimentală, modificările ce apar la nivelul celulelor din rădăcina de usturoi (*Allium sativum*) tratat cu cadmiu, în concentrații diferite, timp de 9 zile. Rezultatele au arătat că acesta induce unele modificări ultrastructurale cum ar fi vacuolizarea citoplasmei, depunerea de material electrono-dens în vacuole şi nucleoli, precum şi creşterea în dimensiuni, urmată de dezintegrare, a unor organite celulare (fig. 30).

Metalele grele acționează asupra macromoleculei de ADN, ceea ce poate determina apariția de aberații cromosomiale, modificări ale duratei fazelor ciclului de diviziune cu repercusiuni asupra creşterii şi dezvoltării normale a plantelor.

Astfel, este cunoscut faptul că plumbul prelungeşte ciclul celular, sensibilitatea față de acest metal depinzând de faza ciclului celular în care se află celulele.

Celulele aflate în faza postsintetică G2 sunt mult mai sensibile la prezența plumbului, care prelungeşte ciclul celular cu până la 216%. În faza de sinteză a ADN-ului celulele sunt mai puțin sensibile, plumbul prelungind ciclul celular cu doar 55%.

La nivelul ADN-ului, în cursul interacțiunii cu ionii metalici apar modificări conformaționale care schimbă parametrii sterici ai macromoleculei. Interacțiunea ADN-ului cu ioni metalici determină o destabilizare a conformației ADN, cea ce implică perturbări ale activității

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

biologice. Astfel, mesajul genetic conținut în secvența deoxiribonucleotidelor din ADN cromosomial, vehiculat prin succesiunea proceselor de replicație – transcripție - translație, apare denaturat.

Structura, stabilitatea şi reactivitatea ADN sunt influențate de cationii esențiali existenți în celule în cantități mici. ADN poate interacționa cu diverşi agenți fizici, chimici sau biologici care induc schimbări în structura sa chimică şi, implicit, modificări ale activității biologice (Jurca, 2005).

Wójcik şi colaboratorii (2005) au încercat localizarea cadmiului în rădăcinile de *Thlaspi caerulescens*. Plantele au fost crescute în condiții controlate şi tratate cu cadmiu în soluția nutritivă a doua zi după aclimatizare. Probele s-au recoltat la nouă săptămâni de la tratament. Pentru identificarea metalelor grele localizate intracelular, Vázquez şi colaboratorii (1992, 1994) recomandă utilizarea sulfitului de argint; însă acesta nu este foarte specific, în sensul că intră în reacție atât cu cadmiul, cât şi cu fierul, zincul şi cuprul; autorii au utilizat pentru precipitarea cadmiului sulfitul de sodiu. Prezența cadmiului în plante s-a manifestat prin diverse simptome de toxicitate cum ar fi: coloarea brună a rădăcinilor, pete clorotice pe frunzele tinere şi pete necrotice pe cele bătrâne. Pe secțiuni transversale prin rădăcini se observă numeroase celule moarte în grosimea parenchimului cortical, cu conturul general modificat, aproape complet degenerate, fără organite celulare vizibile (fig. 31). Între celule apar spații de diverse forme şi mărimi, pline cu material electrono-dens (probabil depuneri de cadmiu); aceste spatii sunt rezultate în urma dezintegrării lamelei mediane şi a distrugerii parțiale a peretelui celular primar. Cadmiul nu se depune numai la nivelul parenchimului cortical ci şi în celulele

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

endodermei, în cilindrul central, în celulele de parenchim lemnos şi în pereţii primari ai vaselor de metaxilem.

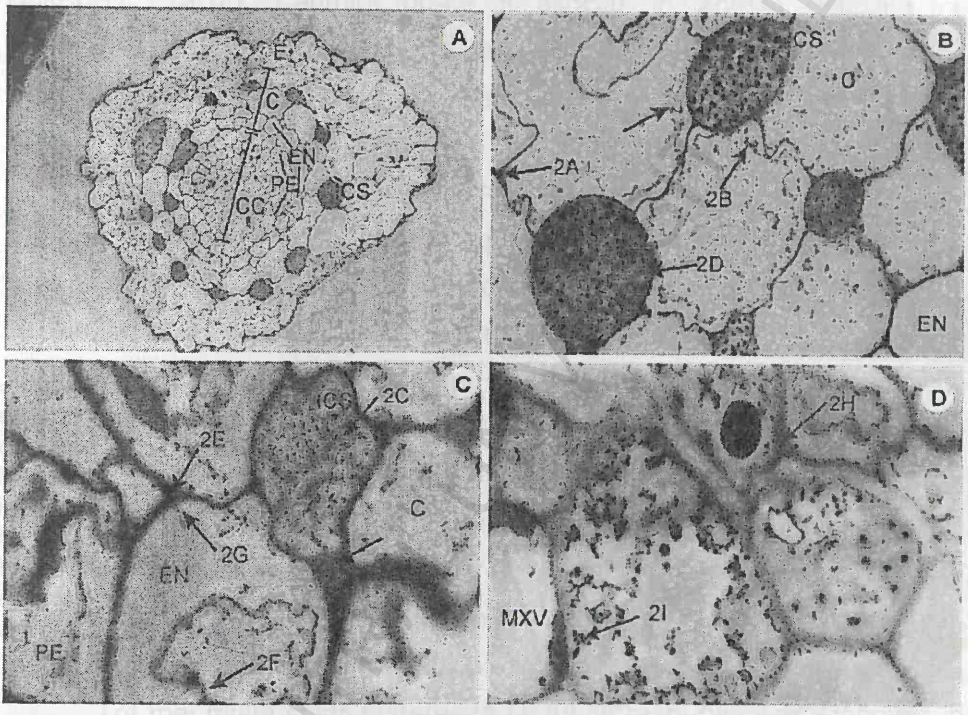


Fig 31 – A – Secţiune transversală prin rădăcina de *Thlaspi caerulescens*; celulele de culoare închisă prezintă depuneri de cadmiu; B - D – detalii din parenchimul cortical şi cilindrul central (E – epidermă, C – parenchim cortical, ICS – spaţiu intercelular, EN – endodermă, PE – periciclu, CC – cilindrul central,MXV – vas de metaxilem (A – x250, B – x2000, C – x3000, D – x4000) (Wójcik et al.,2005).

În acest experiment cadmiul a fost detectat atât în apoplast (în grosimea peretelui celular, spatii intercelulare), cât şi în simplast (în

interiorul protoplastului); localizarea exactă a cadmiului în interiorul protoplastului este dificilă datorita gradului avansat de degradare a acestuia.

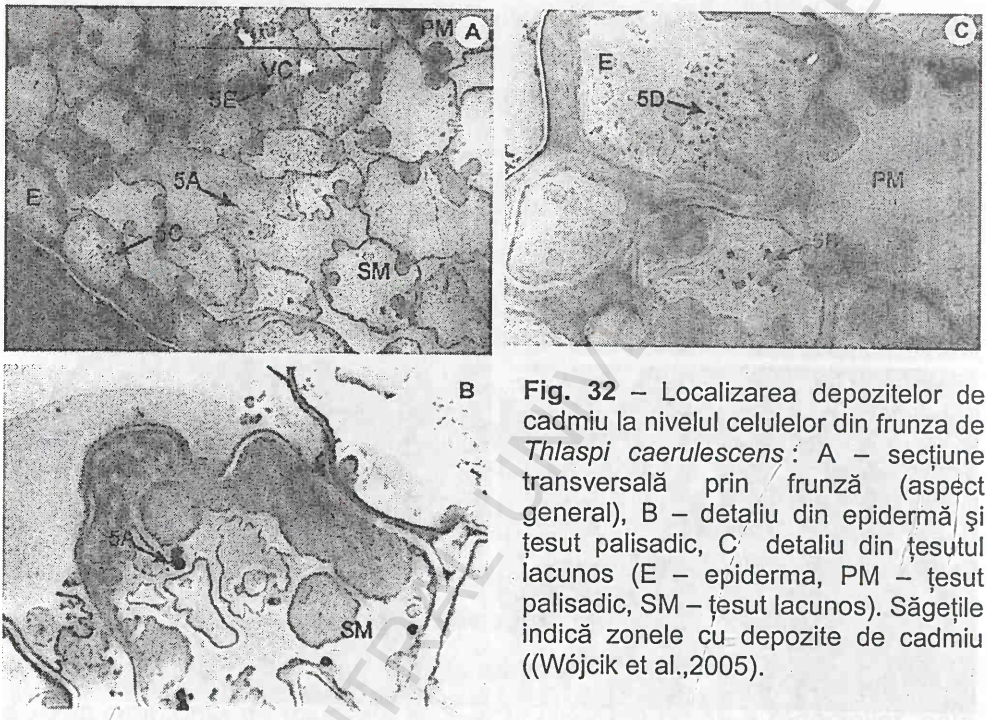


Fig. 32 – Localizarea depozitelor de cadmiu la nivelul celulelor din frunza de *Thlaspi caerulescens*: A – secțiune transversală prin frunză (aspect general), B – detaliu din epidermă și țesut palisadic, C – detaliu din țesutul lacunos (E – epiderma, PM – țesut palisadic, SM – țesut lacunos). Săgețile indică zonele cu depozite de cadmiu ((Wójcik et al.,2005).

La nivelul limbului foliar (fig. 32), cadmiul a fost detectat în vacuole, atât în celulele țesutului asimilator palisadic şi lacunos, cât şi în unele celule epidermice. Localizarea acestuia în mezofil, pe calea parcursă de apa din vasele de lemn spre epidermă, indică clar implicarea transpirației în procesul de translocare a metalelor grele în plante.

Atât în rădăcini, cât şi în frunze, cadmiul a fost observat în celule sub forma unor depozite electrono-dense; această formă de precipitare

este considerată o modalitate mai puțin toxică de stocare a cadmiului, însă natura chimică exactă a acestora rămâne încă necunoscută (Rauser şi Ackerley, 1987). Cadmiul poate fi asociat în aceste depozite cu fitochelatine, acizi organici sau fitați. Acumularea fitochelatinelor este cunoscută ca fiind principalul mecanism de detoxifiere a cadmiului de către plante.

Sinteza fitochelatinelor este provocată de o serie întreagă de metale, dar numărul celor care se leagă de fitochelatine este limitat doar la 4: cadmiu, cupru, plumb şi zinc. Producerea fitochelatinelor şi legarea metalelor intracelulare în exces este un proces foarte rapid şi aparent permite celulei o funcționare aproape normală, fără dereglări de creştere şi dezvoltare.

Cercetări recente arată că fitochelatinele sunt localizate în vacuole, prin urmare ele ar putea reprezenta un sistem de transfer al metalelor din citoplasmă în vacuole unde acestea ar fi izolate, neputându-se implica în procese de o importanță crucială pentru metabolismul celulei şi care, în mare, se desfăşoară în interiorul citoplasmei.

Tot mai multe studii sugerează faptul că răspunsurile metabolice la stresuri diferite ca stresul la căldură, stresul oxidativ, răniri, stresul provocat de anumite metale, se aseamănă. Aceasta indică faptul că pot exista semnale biochimice sau biofizice specifice fiecărui agent stresant care determină celula să declanşeze mecanismele de toleranță (Lazar, 2002).

Van Belleghem şi colaboratorii (2006) realizează un studiu referitor la localizarea intracelulară a cadmiului în rădăcinile şi frunzele de la *Arabidopsis thaliana*. Autorii insistă asupra modificărilor ce pot apărea în cursul prelucrării materialului de analizat (spălarea depozitelor sau

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

translocarea acestora în alte poziții decât cele inițiale. Este recomandată metoda înghețării la presiune ridicată, substituirea cu acetonă utilizând un dispozitiv automat de înghețare-substituire şi apoi infiltrarea cu răşini epoxidice; adițional, în momentul fixării, se poate utiliza sulfitul de sodiu în combinație cu glutaraldehida, pentru a evita mobilizarea cadmiului pe parcursul prelucrării. Materialul analizat a fost reprezentat de rădăcini de *Arabidopsis thaliana*, cultivate în soluție nutritivă Hogland (pH 5,75) şi tratate timp de 21 de zile cu $CdSO_4$ (0,1, 1, 5 şi 50 µM). Analizele au inclus energy - dispersive X - ray microanalysis (EDXMA) combinată cu microscopia electronică cu transmisie. Varianta tratată cu 0,1 µM $CdSO_4$ nu a prezentat acumulări de cadmiu

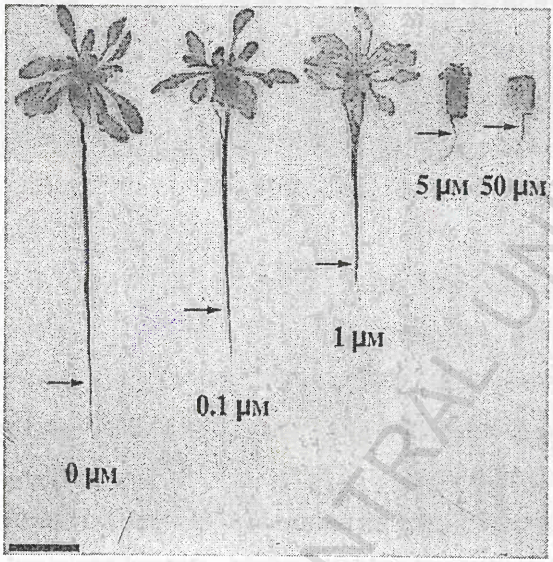


Fig. 33 – Efectul toxic al cadmiului asupra creşterii şi morfologiei plantelor de *Arabidopsis thaliana*; plantele expuse la concentrații de 0,1 şi 1 µM $CdSO_4$ au manifestat pete clorotice pe frunze; cele expuse la doze mari de 5 şi 50 µM $CdSO_4$ au aparatul foliar redus, cu acumulări masive de antociani; inhibarea dezvoltării sistemului radicular sub acțiunea cadmiului explică diferențele de vârstă observate pe secțiunile supuse analizei (probele au fost prelevate din zonele indicate de săgeți) (Van Belleghem et al. 2006).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

detectabile; la varianta tratată cu 1 μM acumularea a fost foarte redusă; la 5 μM acumulările au fost semnificative fără distrugeri masive ale protoplastului, ceea ce a permis realizarea observațiilor. Plasmoliza masivă survenită la probele tratate cu 50 μM $CdSO_4$ a făcut imposibilă comparația între acestea şi variantele anterioare.

La probele tratate cu cantități reduse de cadmiu (1 şi 5 μM $CdSO_4$) metalul a fost detectat numai la nivelul pereților celulari şi în spațiile intercelulare; aceste observații confirmă rezultatele lui Wagner (2003) care precizează că, la concentrații mici, cadmiul se acumulează în pereții celulari, însă vin în contradicție cu studiul realizat de Wójcik şi Tukiendorf (2005) care au constatat localizarea preponderent citoplasmatică a cadmiului în rădăcinile de porumb (*Zea mays*). Rezultatele deseori contradictorii privind localizarea subcelulară exactă a metalelor grele se datorează, în special, modului diferit de prelucrare a probelor, dar şi tratării plantelor analizate cu cantități mari de metale pentru a realiza concentrații detectabile (ceea ce induce o deteriorare a structurilor celulare). La concentrații mari, cadmiul s-a regăsit sub formă de precipitat în interiorul celulelor din parenchimul cortical; din cauza gradului avansat de degradare a celulelor nu e posibilă precizarea exactă a localizării intraprotoplasmatice. La probele tratate cu cantități mai mici de cadmiu s-au observat depozite electronodense în citoplasmă, lângă pereții celulari, însă concentrația a rămas sub limita detectabilă la EDXMA.

Depozitele granulare intracelulare sunt asociate frecvent cu sulf, aceasta indicând conexiunea simplastică a cadmiului cu molecule ce conțin sulf (Cd – fitochelatine sau Cd – sulfid). La nivelul endodermei cadmiul se acumulează în simplast, în cantități mult mai mari decât în celulele

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

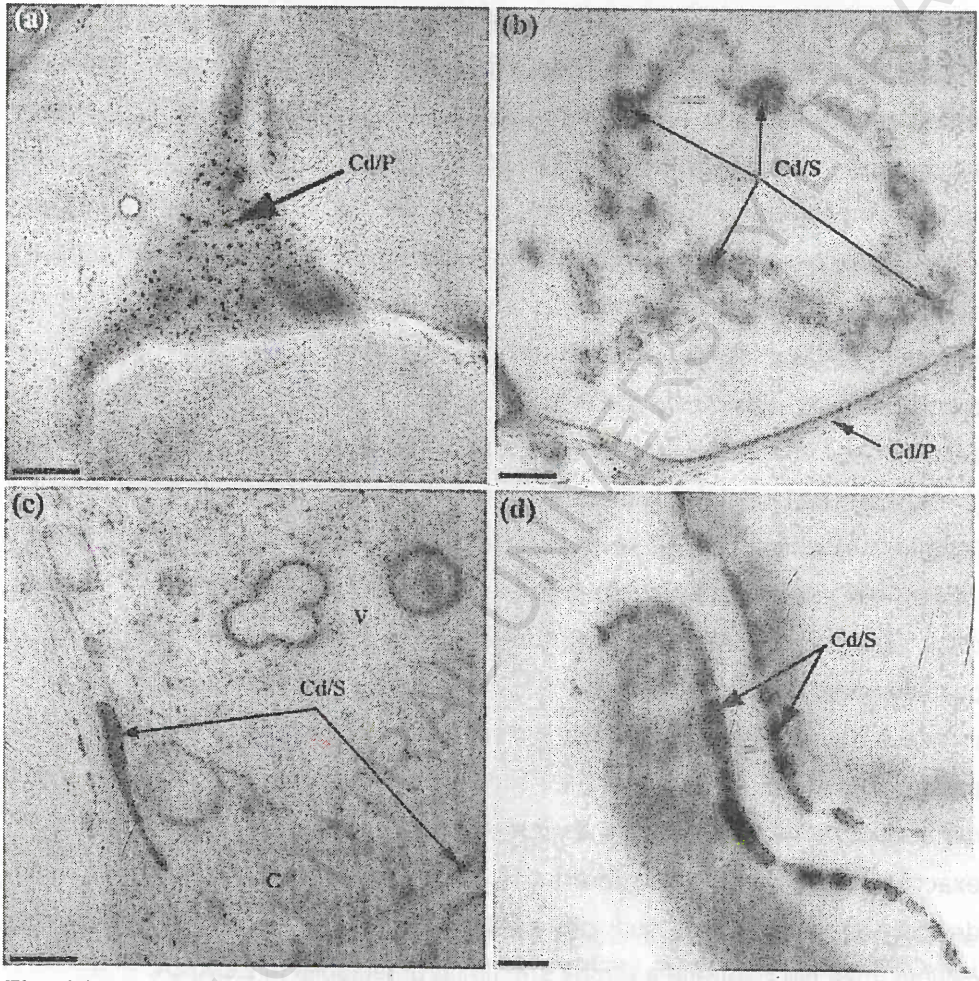


Fig. 34 – Localizarea cadmiului la nivelul celulelor din parenchimul cortical şi a endodermei din rădăcina de *A. thaliana*: a – depozit granular în spațiul intercelular din parenchimul cortical (plante tratate cu 5 μM $CdSO_4$); b – depozit intracelular în parenchimul cortical (plante tratate cu 50 μM $CdSO_4$); c, d - depuneri în citoplasma parietală din celulele endodermei (c - plante tratate cu 5 μM $CdSO_4$, d - 50 μM $CdSO_4$) (Cd/S cadmiu complexat cu sulf, Cd/P – cadmiu complexat cu fosfor) (Van Belleghem et al., 2006).

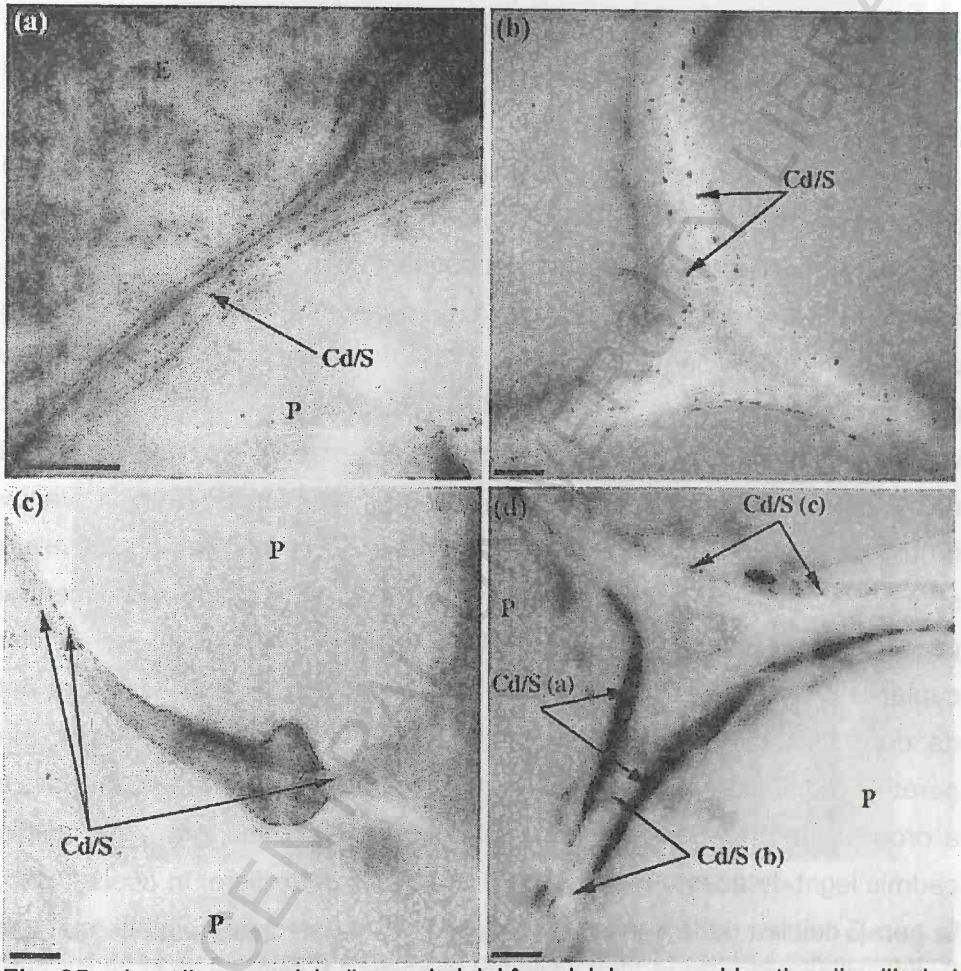


Fig. 35 – Localizarea celulară a cadmiului în celulele parenchimatice din cilindrul central al rădăcinii de *A. thaliana*: a – depuneri granulare în lamela mediană dintre peretele unei celule endodermice şi a uneia din periciclu; b – depuneri în membrana plasmatică a unei celule parenchimatice; c, d – depuneri în lamela mediană şi plasmalema unei celule din periciclu; (plantele au fost tratate cu 5 μM $CdSO_4$; Cd/S cadmiu complexat cu sulf, Cd/P – cadmiu complexat cu fosfor) (Van Belleghem et al. 2006).

parenchimului cortical. Precipitatul electrono-dens se observă în citoplasma parietală, iar cadmiul este complexat atât cu sulf, cât şi cu fosfor, reacția fiind parte a unui proces de detoxifiere.

În apoplastul celulelor parenchimatice din cilindrul central al rădăcinii de la plante tratate cu 5 μM $CdSO_4$ se observă depuneri granulare de cadmiu; acestea sunt localizate predominant la nivelul lamelei mediane, atât la nivelul celulelor din periciclu, cât şi în restul celulelor parenchimatice din componența cilindrului central. Însă, în punctul de joncțiune între celulele endodermice şi cele periciclice, depozitele electrono-dense sunt vizibile în plasmalemă şi nu la nivelul lamelei mediane; acest fapt a fost menționat în urma unui studiu histochimic realizat de Seregin şi Ivanov (2001) care concluzionează că peretele celular la nivelul periciclului are o structură particulară ce forțează ionii metalici să treacă spre cilindrul central pe altă cale decât cea apoplastică. Investigațiile EDXMA au precizat clar cuplarea cadmiului cu sulf în aceste depozite, ceea ce le diferențiază net de depozitele cu cadmiu complexat cu fosfor care au fost detectate în peretele celular. Datorită faptului că în protocolul experimental de preparare a probelor nu a fost adăugat sulf, este cert că depozitele granulare conțin cadmiu legat de acesta în cursul unui proces de detoxifiere; în acelaşi timp, în pereții celulari de la varianta netratată au fost detectate cantități mult mai reduse de sulf.

Acumularea simplastică a cadmiului la nivelul periciclului este importantă deoarece contribuie la reducerea transportului acestuia prin intermediul peretelui celular (care, fiind inert, are o capacitate redusă de control al translocării metalului în corpul plantei).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

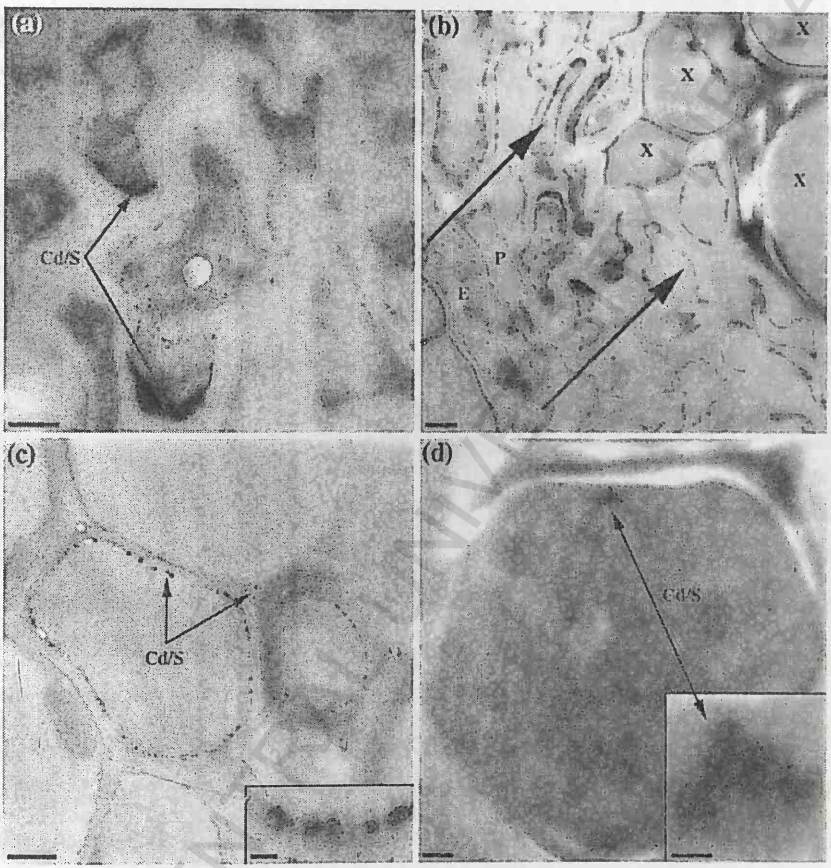


Fig. 36 - Localizarea cadmiului în simplastul celulelor din cilindrul central al rădăcinii de la *A. thaliana*: a – depozite granulare mari în celulele parenchimatice (plantă expusă la 50 μM $CdSO_4$); b – cilindrul central de la aceeaşi plantă (săgeţile delimitează aria de acumulare maximă a cadmiului dintre celulele de pasaj şi polul xilemic; c – depozit granular dintr-un vas de metaxilem – cu detaliu din depozitul citoplasmatic (plantă expusă la 1 μM $CdSO_4$); d – depozit coagulat dintr-un vas matur de metaxilem (plantă expusă la 5 μM $CdSO_4$) (E – endodermă, P – periciclu, X – vas de lemn) (Van Belleghem et al. 2006).

La plantele expuse unei doze crescute de cadmiu (50 μM $CdSO_4$), atât celulele pericliclului, cât şi alte celule parenchimatice din componenţa cilindrului central conţin cantităţi crescute de depozite electrono-dense. Se observă un patern interesant al modului de distribuţie al celulelor ce conţin depozite citoplasmatice: acestea sunt localizate preponderent între endoderma şi polii xilemici ai fasciculelor conducătoare lemnoase. În cazul expunerii la concentraţii mari de cadmiu, acumularea simplastică masivă a acestuia poate fi interpretată ca un fenomen de blocare a accesului ascendent spre tulpină şi frunze, pentru protejarea aparatului foliar.

La nivelul vaselor de lemn cantităţile de cadmiu detectate au fost reduse, atât la martor, cât şi la variantele analizate. Există însă diferenţe evidente între depozitele granulare de la plantele expuse la 1 μM $CdSO_4$ şi cele expuse la 50 μM $CdSO_4$, atât cantitative, cât şi structurale (fig. 28 c, d).

Depozite de cadmiu au fost observate şi la nivelul floemului, în citoplasma tuburilor ciuruite şi în cea a celulelor anexe; deoarece celulele parenchimatice din apropierea fasciculelor liberiene nu prezintă depozite semnificative, se presupune că este vorba de o translocare a acestuia de la nivelul tulpinii şi frunzelor spre rădăcină. Experimental, Reid şi colaboratorii (2003) au demonstrat direcţia de circulaţie a cadmiului în plante, prin aplicarea de ^{109}Cd pe frunzele de cartof (*Solanum tuberosum*). Acesta a fost rapid împrăştiat, pe cale liberiană, în tot corpul plantei; în literatură, translocarea diverselor macromolecule (prin mecanisme selective sau non-selective) pe distanţe mari în corpul plantei este recent descrisă (Chen şi Kim, 2006), însă mecanismul concret de transport al metalelor este încă slab documentat. Nicotinamida este singura moleculă a cărei prezenţă în floem este legată de transportul direct al fierului, cuprului, zincului şi

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

manganului (Stephan şi Scholz, 1993). În acest experiment, la nivelul frunzelor, cadmiul a fost detectat numai la plantele expuse la doza maximă. Autorii concluzionează că acest fapt se datorează, pe de o parte, imoblizării unei cantități semnificative din cadmiul absorbit la nivelul rădăcinii (atât în

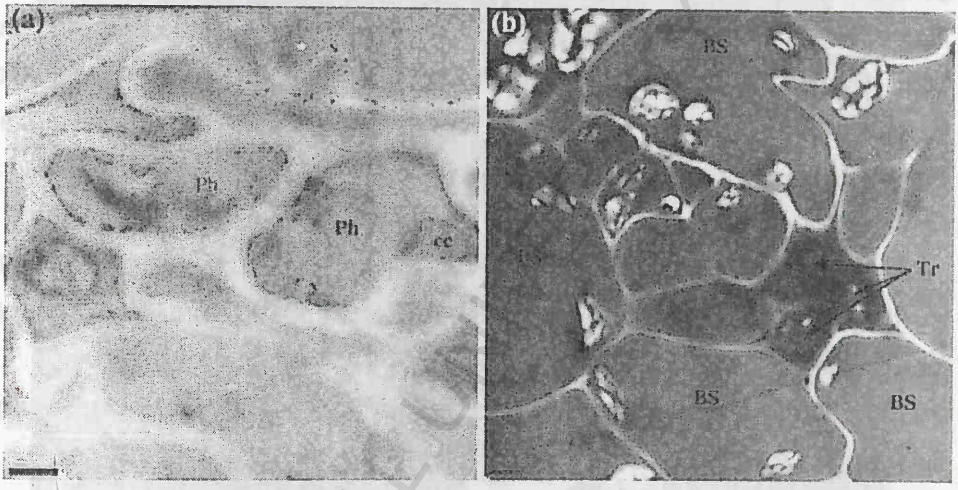


Fig. 37 – a - Localizarea cadmiului în liberul rădăcinii de *A. thaliana* : depozite granulare în citoplasma tuburilor ciuruite şi a celulelor anexe (plantă expusă la la 5 μM $CdSO_4$), b – acumularea cadmiului în vasele de lemn din frunza unei plante expuse la 50 μM $CdSO_4$) (Ph – tub ciuruit, cc – celulă anexă, Tr – traheide) (Van Belleghem et al. 2006).

compartimentul apoplastic, cât şi în cel simplastic), iar, pe de altă parte, retranslocării cadmiului de la nivel foliar, prin intermediul liberului, înapoi în rădăcină.

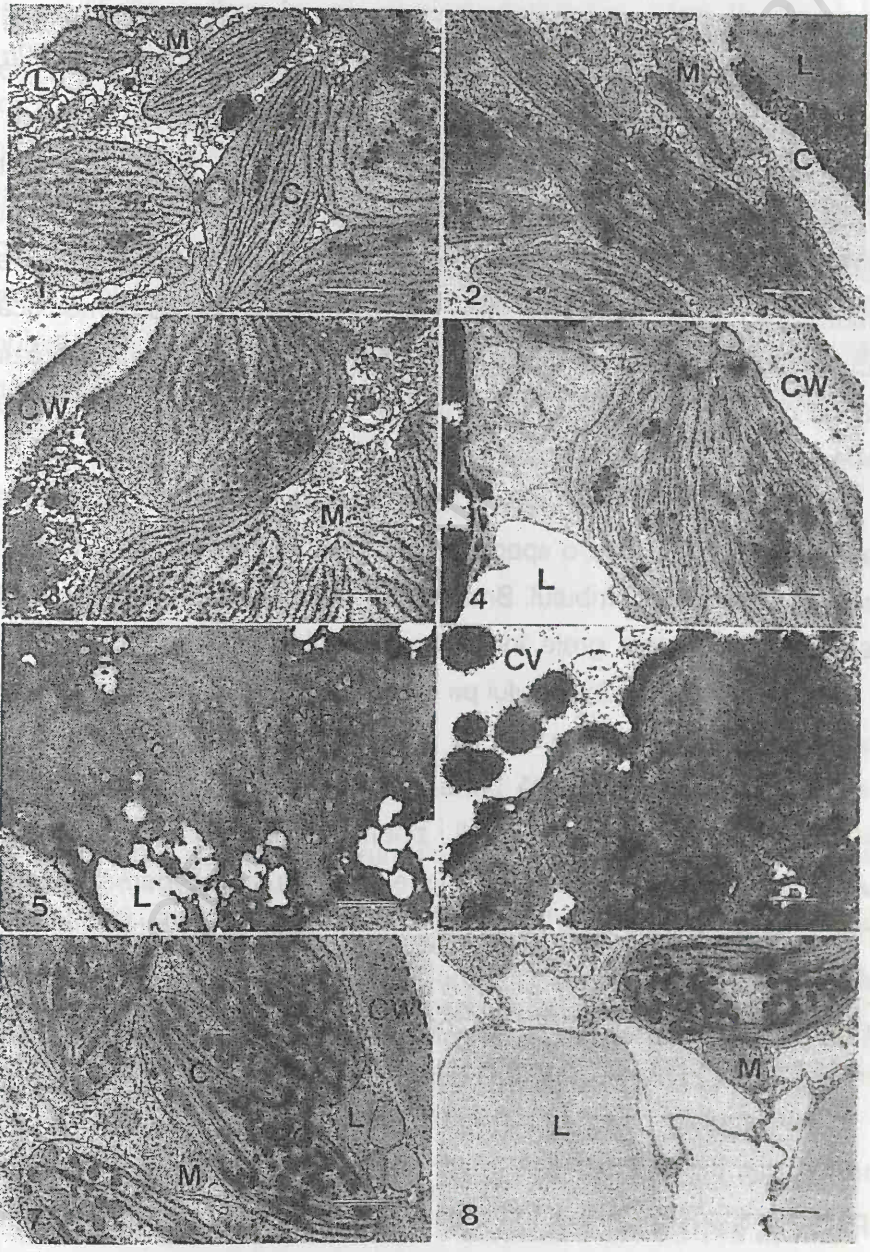
Modificările ce apar în ultrastructura celulelor din mezofilul frunzei de molid (*Picea abies*) sub influența poluării cu dioxid de sulf au fost evidențiate de Wulff şi colaboratorii în 1996. A fost urmărit în special efectul poluării asupra procesului de îmbătrânire. Probele din zona poluată cu dioxid de sulf au fost

comparate cu cele provenite dintr-o plantație în care au fost aplicate îngrăşăminte pe bază de azot şi sulf. La probele recoltate din zona considerată martor nu s-au observat modificări ultrastructurale la nivelul frunzelor bătrâne, comparativ cu cele tinere; cloroplastele au forma sferică sau ovoidală. Tonoplastul şi mitocondriile nu prezintă semne de degenerescență, citoplasma este fină, granulată, bogată în ribozomi (fig. 38). Frecvența celulelor dezintegrate din mezofil este foarte redusă la frunzele mature; acestea au tonoplastul distrus, cloroplastele au anvelopa intactă, rareori întreruptă, tilacoizi umflați şi stroma granulată.

Cloroplastele nu îşi modifică dimensiunile odată cu înaintarea în vârsta a frunzelor, însă dimensiunile plastoglobulilor cresc semnificativ (unele cloroplaste sunt aproape pline de plastoglobuli în al patrulea an de viață). La frunzele din zonele poluate creşte masiv numărul de plastoglobuli şi apar corpi lipidici în vacuole.

Fig. 38 - 1- Frunza de un an din zona-martor, 2 – frunza de 6 ani din zona-martor (se observă creşterea numărului de plastoglobuli şi apariția unui corp lipidic central în vacuolă, 3 – frunza de doi ani din zona fertilizată (se observă creşterea numărului de plastoglobuli), 4, 5 – frunza de 4 ani din zona poluată (se observă depuneri lipidice în vacuolă şi acumulări electrono-opace în peretele celular), 6 – frunza de 6 ani din zona poluată (se observă cloroplaste pline de plastoglobuli şi corpi lipidici în vacuolă), 7, 8 – frunza de 9 ani din zona martor (se observă creşterea semnificativă a numărului de plastoglobuli) (C – cloroplast, CV – vacuola centrală, CW – perete celular, L – corpi lipidici, M – mitocondrie, PG – plastoglobuli) (Wulff et al., 1996). ⇨

BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY


M
L
C
1
M
L
C
2
CW
M
CW
L
4
CV
5
L
CW
C
L
M
7
M
L
8

Soukupova şi colaboratorii (2001) au analizat modificările induse de poluanţii atmosferici la două specii de conifere – *Picea pungens* şi *P. abies* din nordul Cehiei. Secţiunile transversale prin frunza de *P. pungens* au formă romboidală, în timp ce secţiunile prin frunza de *P. abies* sunt mai înalte şi mai înguste. Metoda de identificare a compuşilor fenolici este cea descrisă în capitolul VI.4 dintr-o lucrare a aceloraşi autori (vanilină şi acid clorhidric sau Fast Blue BB) (fig. 39, 40). În acest caz, modificările structurale sunt reduse, iar autorii concluzionează că exoderma reprezintă, pe lângă un ţesut mecanic cu rol în menţinerea formei frunzei aciculare, şi o barieră eficientă împotriva pătrunderii în plantă a poluanţilor.

Choudhury şi Panda (2005) au investigat modificările ultrastructurale ce apar la o specie de briofite (*Taxithelium nepalense*) sub influenţa cromului şi plumbului. Briofitele sunt cunoscute ca fiind organisme ce acumulează metale grele într-o concentraţie mult mai crescută decât cea întâlnită la nivelul substratului pe care aceştia cresc. Capacitatea lor de bioacumulare se datorează, pe de o parte, raportului crescut suprafaţa/volum şi, pe de altă parte, absenţei cuticulei (Carginale et al., 2004). Datorită acestei proprietăţi, briofitele servesc ca biosenzori ai poluării şi, de asemenea, ca model pentru investigarea alterărilor morfologice şi genomice ce au loc datorită acţiunii toxice a metalelor grele (Basile et al., 1995; Bassi et al., 2001). S-a observat că potenţialul reproductiv ridicat al speciilor de briofite reprezintă factorul principal al supravieţuirii lor în medii bogate în metale grele.

Investigaţiile electrono-microscopice (fig. 41) ale talului de *T. nepalense* au arătat modificări în ultrastructura cloroplastelor. Tratamentul cu plumb (expunere 24 ore într-o soluţie 1000 µM de acetat de plumb) a

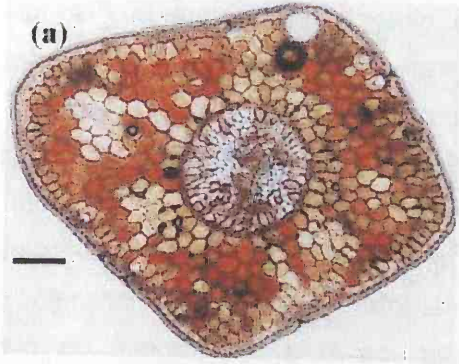
BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

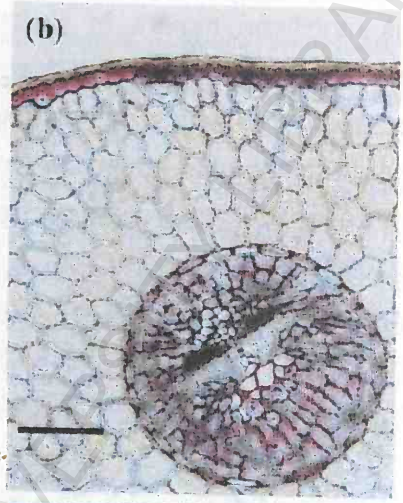
indus modificări majore în structura cloroplastelor, până la distrugerea completă a acestora (fig. 20); dezintegrarea este accentuată în unele cazuri, tilacoizii sunt profund modificați, au loc schimbări ale formei plastidelor. În cazul tratamentului cu crom (soluție 1000 μ de cromat de potasiu) modificările sunt mai puțin dramatice, însă se pot observa schimbări în structura membranară precum şi în forma tilacoizilor. Deci, în comparație cu cromul, plumbul afectează mult mai intens structura membranelor şi a cloroplastelor. Sensibilitatea muşchilor, ca şi a altor specii de plante inferioare la poluarea cu metale grele, a fost raportată şi în investigațiile

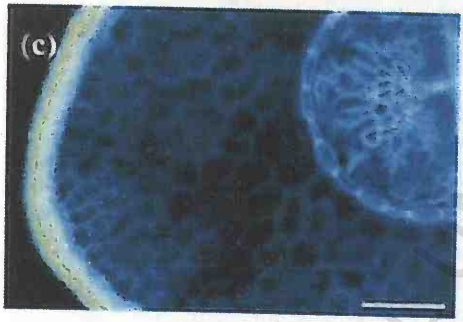
Fig. 39 – Anatomia şi histochimia frunzelor de *P. pungens* – secțiuni transversale observate în lumina normală (a, b, d-g) şi fluorescență (c): a – Secțiune transversală prin frunza de un an – ansamblu (compuşii fenolici sunt colorați în roşu-brun cu Fast Blue BB); b – identificarea histochimică a ligninei (cu fluoroglucină), c – localizarea flavonoizilor în celulele epidermice şi a acidului ferulic în pereții celulelor din mezofil; d – mezofilul compact (colorație cu safranină); e, f, g – localizarea compuşilor fenolici în vacuolele celulelor din mezofil (Soukupova et all., 2001).

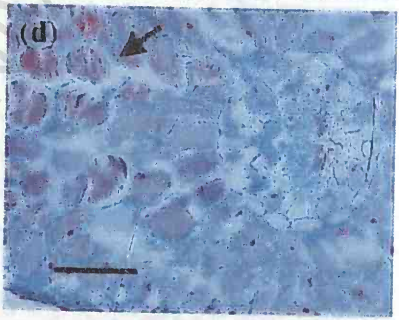
⇨

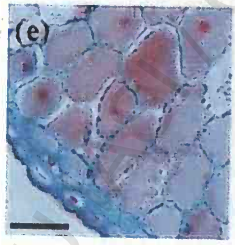
BCU IAŞI - CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

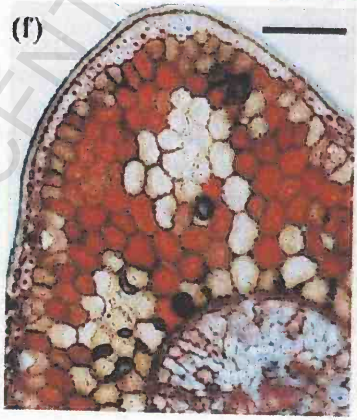


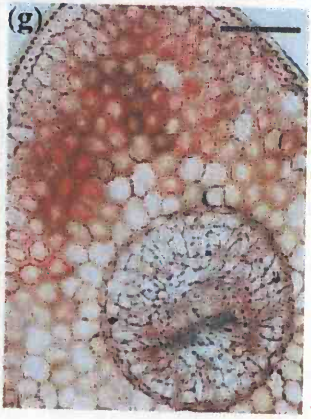












BCU CLUJ CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

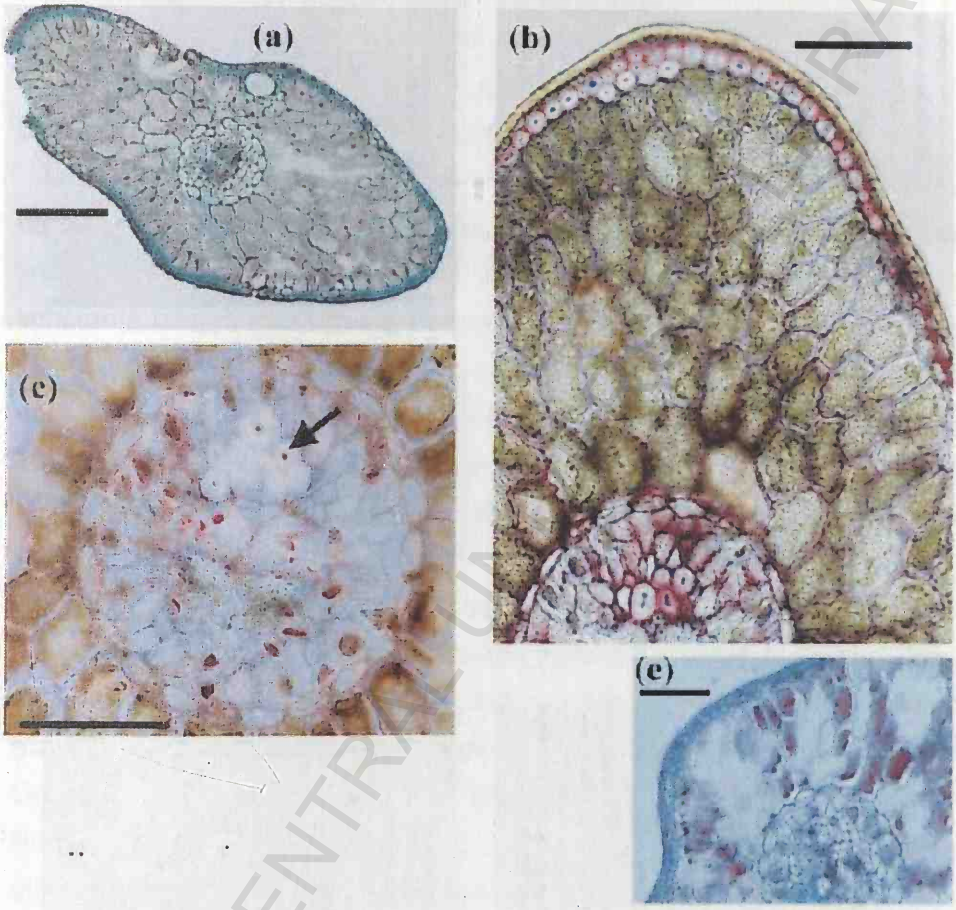


Fig. 40 - Anatomia şi histochimia frunzelor de *P. abies* – observații in lumină directă (a, b, c, e): a – secțiune transversală prin frunza de un an (ansamblu – colorație cu safranină şi fast green); b, c - localizarea histochimică a ligninei (colorație cu fluoroglucină); e – spații intercelulare mari in mezofil (Soukupova et al., 2001).

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

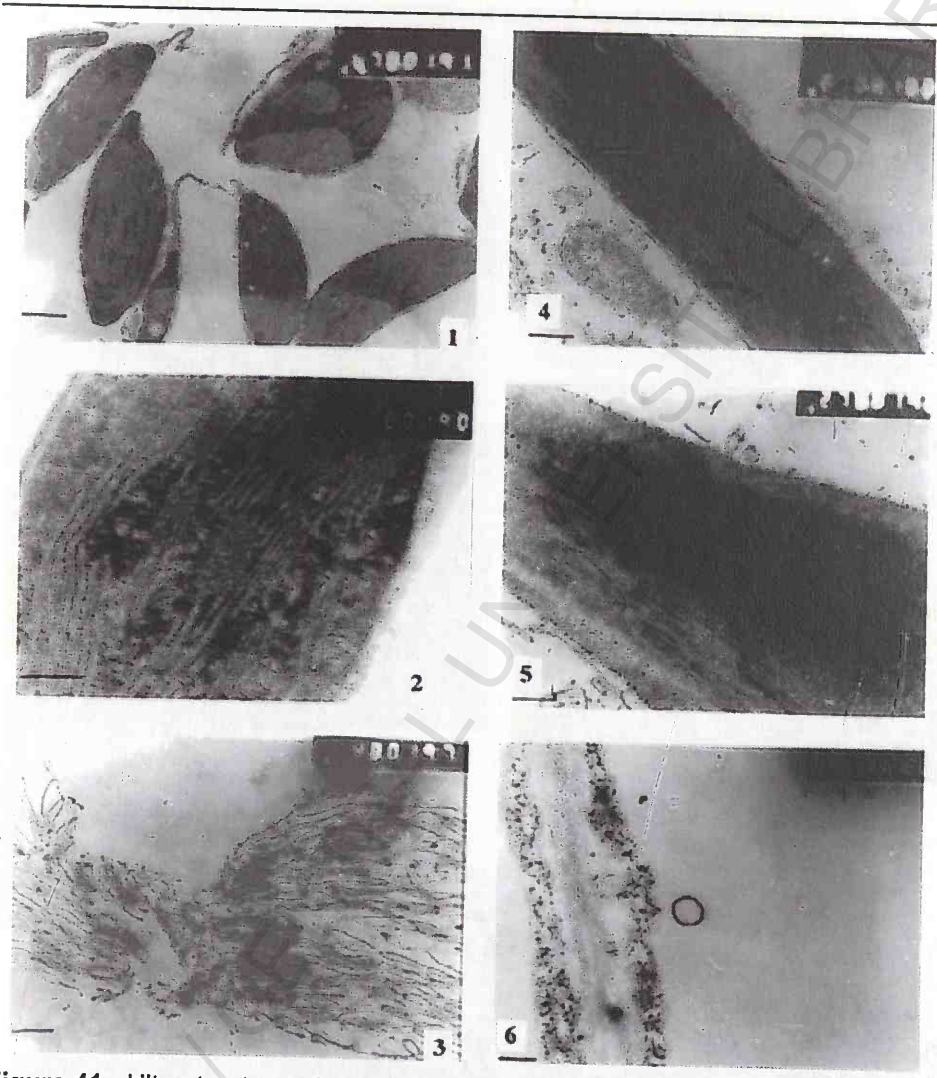


Figura 41 - Ultrastructura tulpinii de *Taxithelium nepalense* : se observă alterări ale structurii cloroplastelor sub influența tratamentului cu plumb şi crom (concentrație de 100 µM pentru 24 ore) : 1 - 3 aspectul cloroplastelor în cazul probei-martor şi al celor tratate cu plumb, respectiv crom ; 4 - 6 aspectul membranei celulare în cazul aceloraşi probe (scara – 5 µm) (Choudhury şi Panda, 2005).

altor cercetători (Epstein et al., 1986; Kardish et al., 1987; Brown and Sidhu, 1992; Gonzalez and Pignata, 1994; Garty et al., 1997; Saxena et al., 1999; Garty et al., 2001; Cabral, 2003; Panda, 2003; Carginale et al., 2004).

Scăderea valorilor substanței uscate la plantele din zone poluate se datorează probabil şi inhibării diviziunilor celulare sub influența metalelor grele (Goldbold şi Kettner, 1991). În mod similar, scăderea cantității de substanță uscată este urmată de scăderea cantității de pigmenți clorofilieni (scădere mult mai accentuată în cazul plumbului față de crom). Studii anterioare (Baszynski et al., 1981; Moustakas et al., 1994; Appenroth et al., 2001; Panda şi Patra, 2000; Panda et al., 2002; Panda et al., 2003; Panda, 2003) au evidențiat şi în cazul altor specii reducerea cantității de clorofilă în urma intoxicării cu plumb şi crom – reducerea clorofilei totale poate fi considerată un răspuns la acțiunea acestui tip de agenți poluanți.

Muşchii sunt hiperacumulatori de metale grele. Tratamentul cu crom şi plumb la care au fost expuşi în acest experiment, pentru numai 24 de ore, a condus la o acumulare semnificativă a acestor metale grele în țesuturi. Un comportament similar al unor briofite şi licheni a fost raportat şi de Bargagli et al., 1998; Vincent et al., 2001; Saxena et al., 2001. Plumbul utilizează pentru transportul membranar canalele care servesc, de regulă, pentru transferul ionilor esențiali (Clemens, 2001), ceea ce poate reprezenta un motiv pentru acumularea masivă şi rapidă a acestuia în țesuturile de la *Taxihtelium nepalense.*

Modificările cloroplastelor din punct de vedere ultrastructural includ distrugerea anvelopei plastidiale, distrugerea tilacoizilor (mai intensă sub influența plumbului şi mult mai scăzută în cazul cromului); aceste modificări au fost observate şi la alte specii de plante superioare, fără legături

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

taxonomice cu briofitele – *Avena sativa, Pisum sativum* (Moustakas et al., 1994; Sandalio et al., 2001). În toate cazurile sunt evidente modificări membranare (atât la nivelul plasmalemei, cât şi al membranelor duble ale diverselor organite celulare).

V. 3. Studiu de caz – Parcul național Ceahlău şi zona limitrofă

Au fost luate în studiu specii de plante lemnoase şi ierboase din perimetrul analizat. Acestea sunt reprezentate de *Plantago media, Trifolium pratense, Trifolium repens, Lotus corniculatus, Picea abies, Tilia tomentosa, Aesculus hippocastanum, Populus tremula.*

Speciile au fost alese astfel deoarece au o mare răspândire în aria studiată, ceea ce a permis recoltarea lor din diverse staționare, cu diferite grade de poluare, pentru a putea realiza o analiză comparativă care să pună în evidență modificările ce pot servi ca biomarkeri pentru evaluarea impactului antropic din zonă. Prelevarea s-a făcut în trei puncte şi anume Taşca Sat (probele martor), Carpatcement încărcare şi Taşca gară (zone poluate).

Prin frunzele şi tulpinile supuse analizei ultrastructurale au fost realizate mai întâi secțiuni transversale care au fost observate la microscopul fotonic.

Pe secțiuni transversale prin frunza de *Lotus corniculatus* se observă depozite fenolice, mai mult sau mai puțin evidente, prezente atât în celulele epidermice, cât şi în celulele țesutului asimilator, izolat sau grupat. Ca răspuns fiziologic la stres, plantele pot sintetiza şi acumula un larg

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

spectru de compuşi fenolici. Aceştia apar ca urmare a modificărilor diverselor căi din metabolismul plantei şi nu prin depunere din mediul extern, deoarece epidermele (atât celulele, cât şi pereţii lor externi) sunt intacte. În unele regiuni ale foliolelor se observă şi zone de necroză, cu celule dezintegrate în urma acumulării de compuşi fenolici (fig. 42). Epidermele văzute de faţă nu prezintă modificări semnificative în ceea ce priveşte forma generală a celulelor epidermice sau a stomatelor.

Pe secţiunile fine observate la microscopul electronic în celulele mezofilului frunzelor colectate din zone nepoluate (martor) se observă numeroase cloroplaste, cu grane bine definite, cu plastoglobuli mici, electrono-denşi. Celulele au vacuole mari, centrale. Secţiunile prin frunzele recoltate din zone poluate arată grade diferite de dezorganizare la nivelul mezofilului. În frunzele recoltate de la Carpatcement încărcare celulele mezofilului conţin cloroplaste mari, cu câteva granule de amidon tranzitoriu; citoplasma prezintă semne de degenerescentă. Pot fi observate, de asemenea, structuri multiveziculare, care uneori conţin material electrono-dens. Pe unele secţiuni au fost observate formaţiuni electrono-transparente în citoplasmă şi uneori în vacuole. În cele mai multe celule depozite electrono-dense au fost observate continuu, în lungul pereţilor celulari. În majoritatea celulelor mezofilului frunzelor colectate din zone poluate vacuolele au dimensiuni mult mai mari decât la martor şi împing citoplasma spre peretele celular. Din această cauză cloroplastele apar mai des de formă aplatizată, faţă de cele lenticulare observate în celulele mezofilului de la martor. În unele celule vacuolele sunt pline cu material electrono-dens, în altele ele au un aspect complet transparent. Tonoplastul se păstrează în

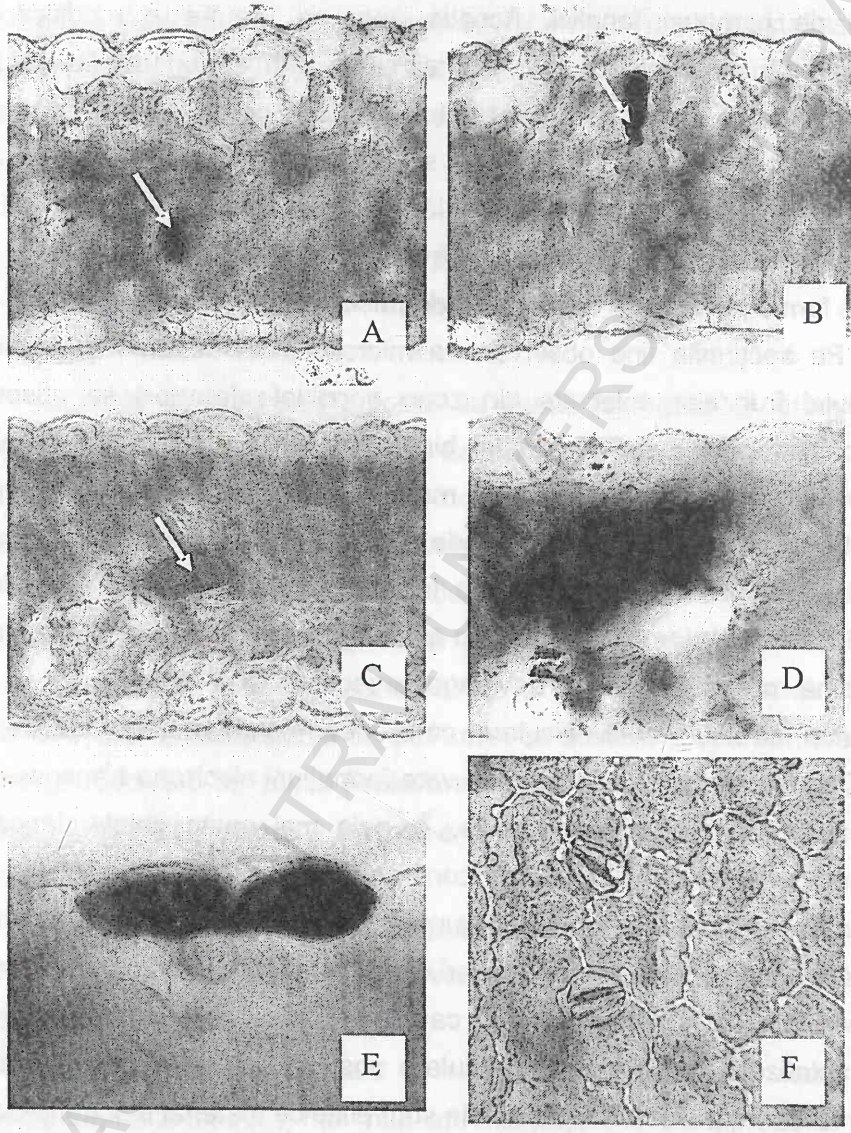


Fig. 42 - Secțiuni transversale (A - E) şi superficiale (F) prin frunza de *Lotus corniculatus* (A, B – Carpatcement încărcare, C – Taşca Gară, D - F – Sat Taşca).

ambele cazuri intact, ceea ce denotă o menținere a diferiților compuși celulari în interiorul vacuolelor.

Depozite electrono-dense, probabil reziduuri ale unor vezicule degenerate, pot fi uneori observate și în spațiile intercelulare.

În frunzele recoltate din locația Taşca gară, în lungul pereților celulari se observă depozite compacte de material electrono-dens, care uneori apare chiar încrustat în perete. Acestea sunt prezente și în spațiile intracelulare și la periferia celulelor.

Într-un stadiu mai avansat de degenerare au fost observate unele celule din mezofil situate în apropierea epidermei superioare. Acestea conțin cloroplaste cu anvelopa plastidială degradată, precum și modificări evidente ale sistemului tilacoidal, atât în interiorul granelor, cât și la nivelul stroma-tilacoizilor. În interiorul cloroplastelor sunt vizibile particule electrono-dense. De asemenea, la nivelul citoplasmei, se pot observa corpusculi electrono-transparenți, alături de cei electrono-denși care au fost deja menționați în stadiul anterior. Treptat, toate organitele celulare se degradează ca urmare a morții celulei. În acest stadiu de necroză celula nu mai păstrează nici o formă de organizare, nucleul nu se mai observă, ca și mitocondriile, vacuolele au fuzionat cu citoplasma, ducând la completa ei degenerare, iar depozitele electrono-dense sunt neuniform răspândite în celule, fiind în continuare aderente la nivelul pereților.

Prezența compușilor fenolici în celulă nu este un fenomen neobișnuit pentru multe specii de plante (Bialonska et al., 2007), însă precipitarea acestora în citoplasmă și în vacuolă reprezintă un indiciu cert al dereglării cailor metabolice celulare ca urmare a stresului indus de diverse substanțe, printre care metalele grele prezente și în zona

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

investigată de noi (datorita cantității mari de fum emis de țevile de eşapament mai ales în apropierea drumurilor județene).

Prezența acestor depozite ar putea fi datorată faptului că proprietățile fenolilor se modifică în funcție de cantitatea de metale grele prezente în mediu. Unii compuşi fenolici se acumulează în jurul anvelopei cloroplastelor, alții în jurul veziculelor citoplasmatice şi a tonoplastului. Uneori, mai rar într-adevăr, astfel de compuşi au fost observați chiar în interiorul pereților celulari.

Prezența depozitelor fenolice în apropierea membranelor plasmatice şi a dublelor membrane ce înconjoară organite cum sunt cloroplastele şi mitocondriile sunt în concordanță cu siturile subcelulare de biosinteză a acestora (Dixon şi Paiva, 1995).

Apariția şi acumularea produşilor fenolici în vacuole precum şi în zona apoplastică (a peretelui celular) joacă un rol important în eliminarea radicalilor liberi produşi în urma metabolismului celular. Din moment de diverse studii au dovedit rolul antioxidant al compuşilor fenolici, acumularea acestora în celulele mezofilului frunzelor din zone expuse la poluare sugerează că aceştia ar contribui la reducerea stresului oxidativ şi limitează distrugerile aparatului fotosintetizant (Feucht et al., 1994). Alte studii au arătat că acumularea ionilor metalici în celule stimulează producerea de compuşi fenolici, deci prezența metalelor grele, îndeosebi plumbul, în aria investigată de noi, ar putea reprezenta unul din factorii care determină acumularea şi precipitarea compuşilor polifenolici atât în vacuole cât şi în citoplasmă sau în spatiile intercelulare. În momentul de față există încă puține studii referitoare la efectele apariției polifenolilor la nivel celular ca urmare a răspunsului la stresul oxidativ (Sakihama et al., 2002). Dacă în

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

cantități mici polifenolii pot avea rol protector, producerea lor în cantități mari ca urmare a acțiunii susținute a factorilor poluanți este letală pentru celule, ducând inițial la microleziuni şi ulterior chiar la necroze, pe arii diferite în funcție de intensitatea acțiunii poluanților.

Unii compuşi fenolici pot crea în combinație cu metalele chelați (Harborne, 1994). Aceasta indică faptul că prin procesul de chelatizare se poate modifica semnificativ translocarea metalelor grele în celulele plantelor şi chiar în țesuturile acestora. Investigații recente (Jarvis şi Leung, 2001) au demonstrat localizarea intracelulară la nivelul cloroplastelor şi al plasmodesmelor în cazul expunerii unei alte specii de leguminoase (*Chamecytisus*) la intoxicare cu plumb.

Unul din simptomele vizibile ale acțiunii poluanților, în special a gazelor de eşapament în acest caz, este mărirea volumului vacuolar, determinată probabil şi de acumularea ionilor metalici în vacuolă. Prezența depozitelor electrono-dense în vacuole precum şi apariția corpilor veziculari în citoplasmă par a fi trăsături comune ale plantelor care au fost supuse poluării cu metale grele.

Prezența şi acumularea metalelor grele la nivelul vacuolelor au mai fost puse în evidență, prin metode fizice şi chimice, în alte studii efectuate de Heumann (2002), Jarvis şi Leung (2001), Maruthi Sridhar et al. (1996).

Izolarea ionilor metalici în vacuole şi în complexele veziculare din citoplasmă este legată de procesul de detoxifiere şi toleranță a plantelor la aceşti compuşi, după cum arată investigațiile făcute de Coleman et al (1997), Tonget al (2004). În plus, formarea unor complexe ale acestora cu diverşi compuşi secundari de metabolism sugerează prezența unui mecanism care să izoleze stabil metalele grele în vacuole şi complexe

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

veziculare, limitând astfel, până la un punct, efectele nocive ale acestora asupra metabolismului celular (Ernst, 1998).

Peretele celular este, de asemenea, un compartiment responsabil pentru manifestarea toleranței plantelor la metale grele. Acumularea metalelor grele în pereții celulari reprezintă un mecanism cunoscut de protejare a plasmalemei şi de menținere a unui nivel scăzut al concentrației acestora în vacuole (Ernst, 1998, Ton get al., 2004). Însă acumularea metalelor grele în interiorul peretelui celular poate avea efecte negative în funcționarea compartimentelor enzimatice existente la acest nivel.

Depozitele polifenolice observate de noi în acest studiu sunt localizate preponderent lângă peretele celular şi mai rar în interiorul acestuia, în spațiile intercelulare precum şi aderent de peretele primar. Investigații anterioare au demonstrat faptul că plumbul are o afinitate crescută în a se lega de pectină mai degrabă decât de celuloză şi hemiceluloze (Wierzbicka, 1998). Lamela mediană a peretelui celular este predominant formată din substanțe de natură pectică, iar peretele celular primar conține în mare parte celuloză şi hemiceluloză. În lumina acestor observații putem aprecia că existența depozitelor electrono-dense în pereții celulari la unele probe investigate de noi denotă legarea plumbului, prezent în cantitate mare şi care acționează ca agent poluant, de substanțele pectice din componența lamelei mediane şi a peretelui celular primar. Existența depozitelor electrono-dense şi la nivelul spatiilor intercelulare a fost semnalată la porumb (*Zea mays*) şi de alți cercetători (Tung şi Temple, 1996). Prezența lor sugerează un transport apoplastic al plumbului prin peretele celular precum şi precipitarea şi acumularea lui în aceste spații când este prezent în cantități mari.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

În studierea localizării subcelulare a metalelor grele, în special a plumbului, se pot utiliza diferite tehnici de preparare a materialului în microscopia electronică cu transmisie. Metodele convenționale de fixare şi impregnare cu răşini epoxidice (de tip Epon 812, metoda utilizată şi de noi în cercetarea de față) este considerată suficientă deoarece plumbul rămâne în țesuturi şi nu este spălat de fixatori sau de substanțele utilizate la deshidratare (Jarvis şi Leung, 2001, Tung şi Temple, 1996). Spre deosebire de acesta, alte metale cum ar fi zincul şi cadmiul sunt spălate într-o proporție mare atunci când sunt utilizate metodele convenționale (Heumann, 2002). Însă, datorită faptului că, dintre metalele grele susceptibile a acționa drept factori poluanți, în staționarele investigate de noi se află doar plumbul, am considerat metoda clasică de fixare cu tetraoxid de osmiu şi glutaraldehidă suficientă pentru a evidenția prezența, depozitarea şi concentrarea acestuia în materialul analizat. În general metalele se acumulează în diferite organite celulare tocmai datorită tendinței de a fi izolate de restul compartimentelor ce participă la metabolismul celular (fig. 43). Numai în celulele necrozate sau care prezintă un început de degenerare acestea se pot observa dispersate neregulat în citoplasmă. Nu este cunoscut încă dacă distrugerea celulelor este cauzată de prezența acestor metale sau ele migrează şi penetrează în special celulele care au suferit deja leziuni ireversibile (Heumann, 2002). Dezorganizarea membranelor celulare duce în final la moartea celulei, urmată de necroza zonei respective. Fragmente din vezicule şi celule deteriorate se pot observa în spațiile intercelulare.

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

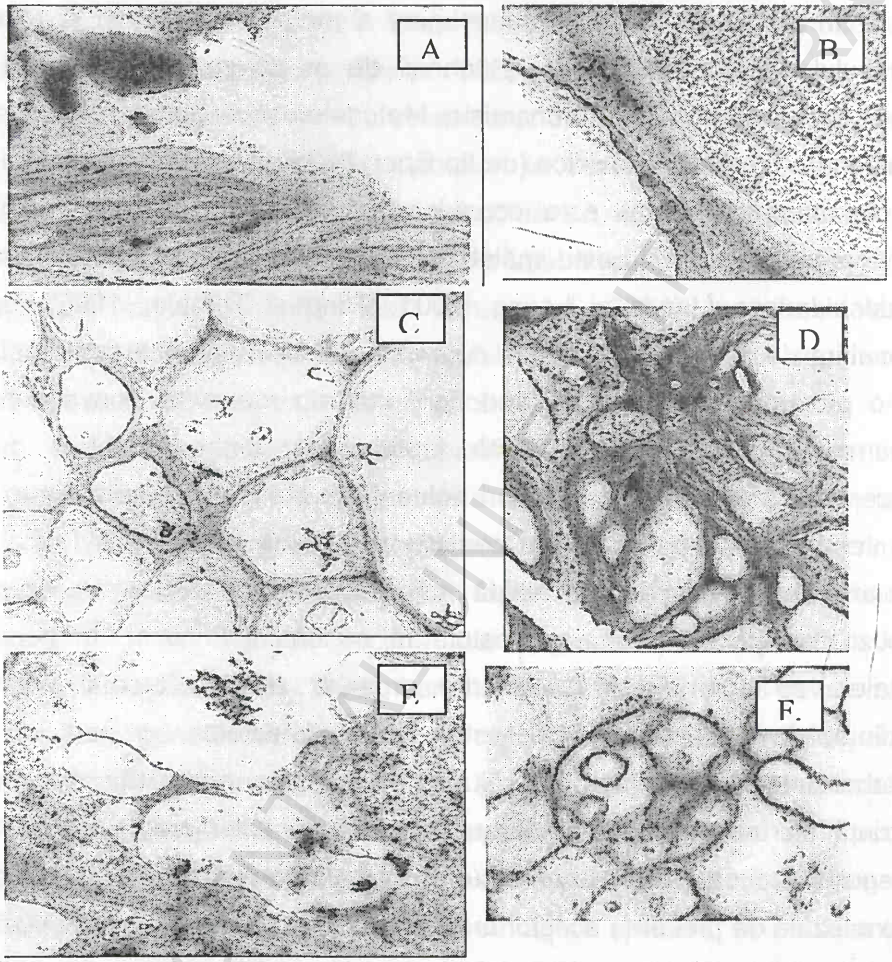


Fig. 43 – Aspecte TEM ale celulelor din mezofilul foliar şi din ţesutul conducător al nervurii frunzei de *Lotus corniculatus* recoltată din zone cu diferite grade de poluare: A – Carpatcement încărcare – se observă cloroplaste cu plastoglobuli mari, aglomeraţi, b –depuneri de polifenoli în peretele celular, C – ţesut conducător, D – Taşca Gară – cloroplaste cu granule de amidon foarte mari, ce duc la dezorganizarea sistemului tilacoidal, E – depuneri polifenolice, E – sisteme multiveziculare.

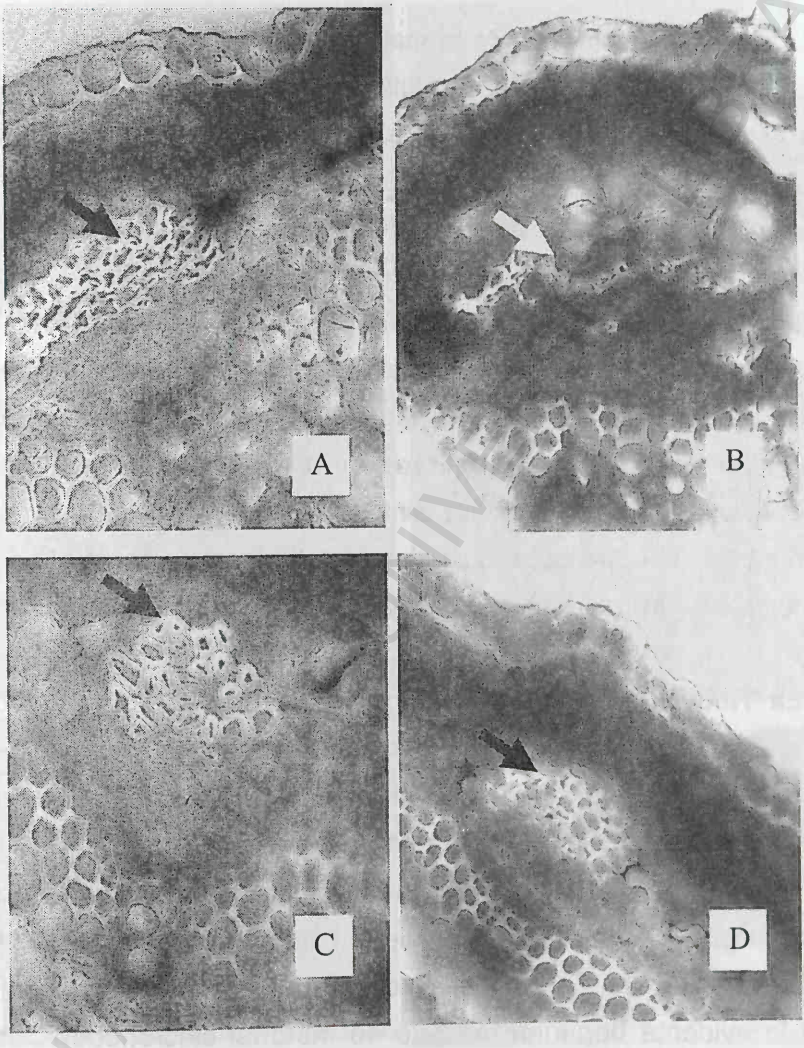


Fig. 44 - Secțiuni transversale prin tulpina de la *Lotus corniculatus* din zone cu diferite grade de poluare: A, B – Carpatcement încărcare, C, D – Taşca gara. Se observă deformări ale țesutului mecanic (sclerenchim) precum şi zone necrozate în apropierea acestuia.

Acest fenomen se poate extinde la mai multe celule învecinate rezultând veritabile zone de necroză. Dacă celulele necrozate izolate nu afectează major existența frunzei, putând reprezenta chiar regiuni de izolare a poluanților, zonele mai întinse afectează metabolismul foliar şi duc, în cele din urmă, la moartea foliolei, fiind unul din principalele cauze ale defolierilor semnalate ca efect al influenței poluanților atmosferici.

La nivelul tulpinii modificările induse de poluanții atmosferici sunt legate în special de structura sclerenchimului a cărui morfogeneză este vizibil afectată. Pe lângă fibrele de sclerenchim normale, cu pereții uniform îngroşați şi moderat lignificați, apar zone în care fibrele au pereți subțiri, uneori ondulați, ceea ce le reduce simțitor din funcționalitatea legată de susținerea tulpinii. Adiacent cordoanelor de sclerenchim se mai observă şi celule necrozate, în interiorul cărora s-au acumulat cantități mari de tanin (fig. 44).

La *Trifolium pratense* investigațiile au urmărit atât modificările structurale, cât şi pe cele ultrastructurale de la nivelul tulpinii şi a frunzei (fig 45). La probele din zonele poluate se observă depuneri de compuşi fenolici într-o manieră asemănătoare cu cea descrisă anterior pentru specia *Lotus corniculatus*. Atât în frunză, cât şi în zonele externe ale tulpinii, apar celule cu un conținut închis la culoare, vizibile la microscopul fotonic. În celulele care au un aspect relativ normal la acest nivel, investigațiile ultrastructurale au pus în evidență depuneri discrete de material elecronodens atât în vacuole, cât şi în citoplasmă, în special în apropierea pereților celulari. Aceste cantități mici de polifenoli nu afectează major funcționalitatea celulelor, deoarece este vizibilă menținerea integrității membranare atât în ceea ce priveşte plasmalema, cât şi membranele ce compun anvelopele

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

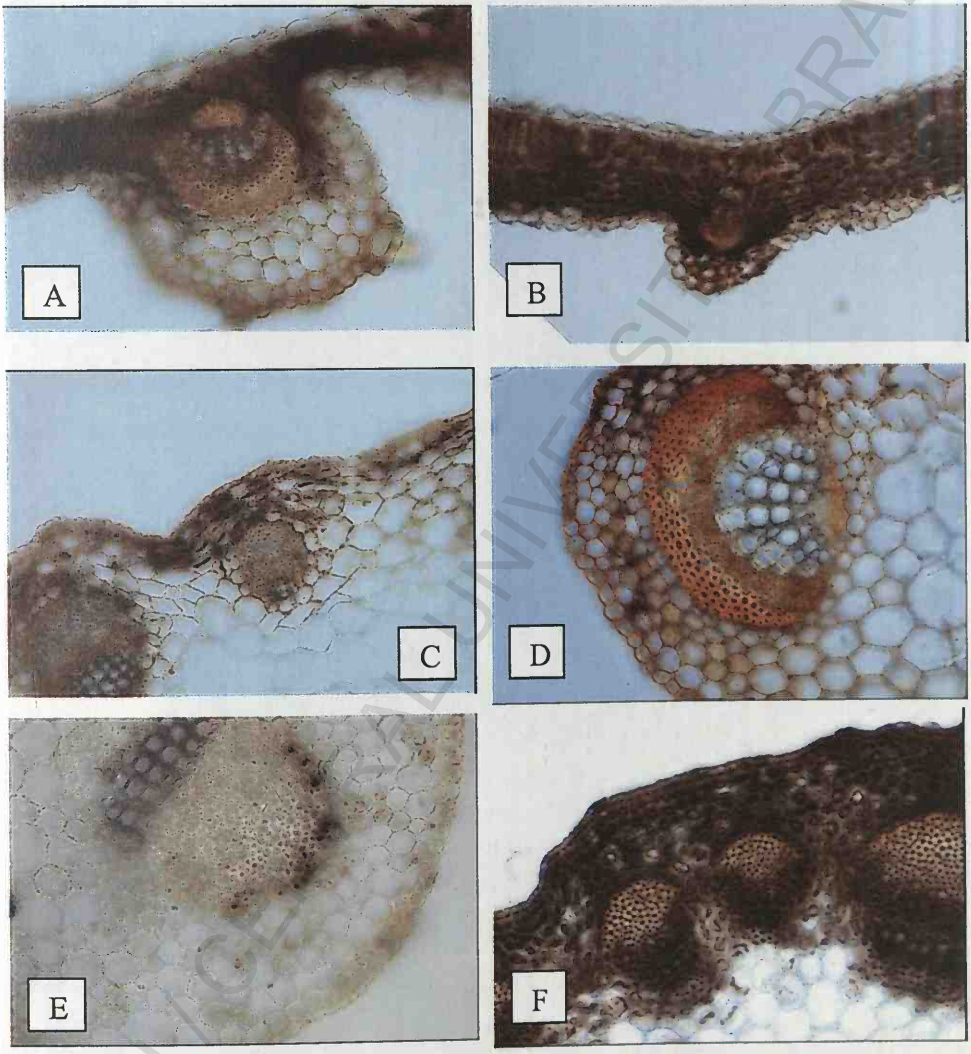


Fig. 45 – Secțiuni transversale prin foliola (A, B), peţiolul (C, D) şi tulpina (E, F) de la *Trifolium pratense* colectat dintr-o zonă poluată (Carpatcement încărcare).

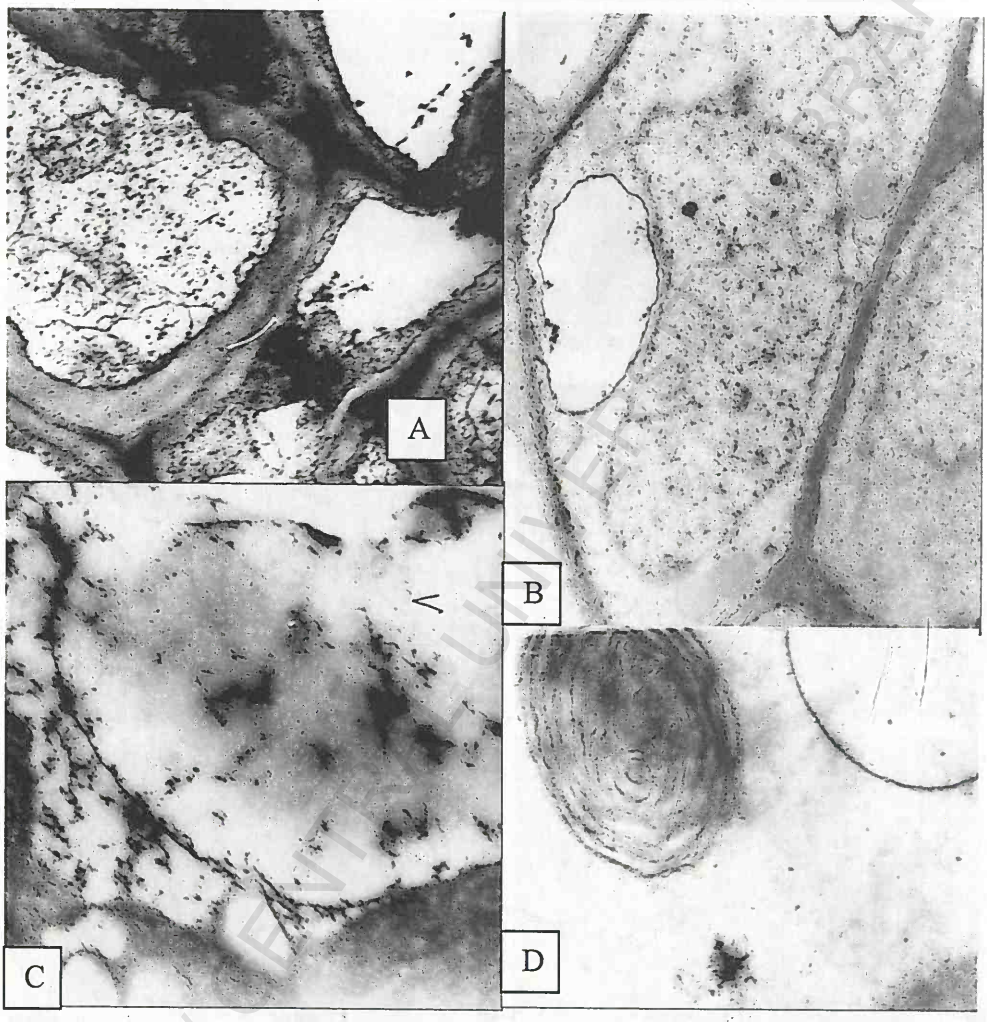
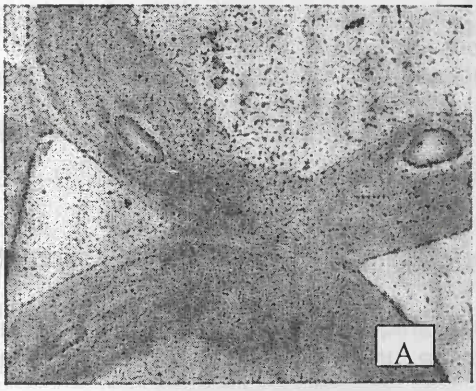
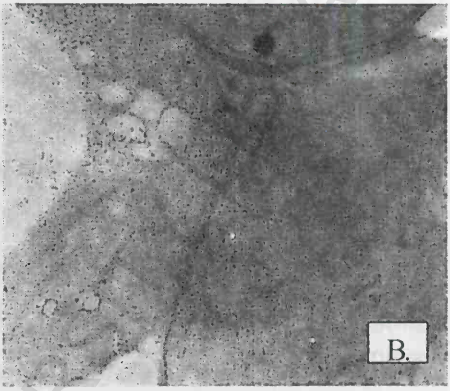
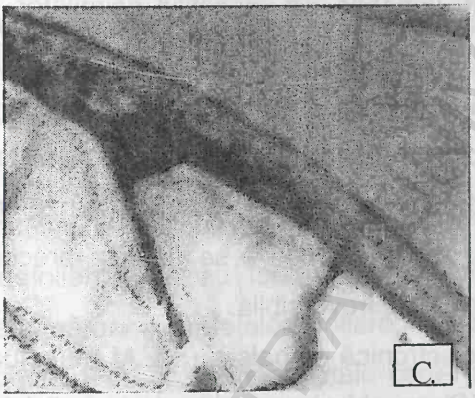


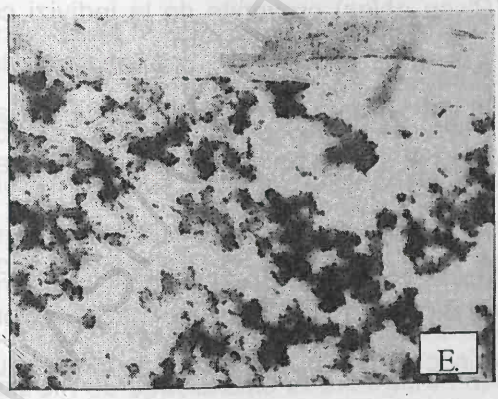
Fig. 46 - Aspecte ultrastructurale ale tulpinii de la *Trifolium pratense* (Carpatcement încărcare) A - tuburi ciuruite din partea terminală a tulpinii; B – celule meristematice din procambiu cu structură normală (se observă păstrarea integrității sistemului membranar); C – depuneri de material electrono-dens în vacuolă: D – sisteme multiveziculare.


A


B.


C.

D


E.

F.

Fig. 47 – Aspecte ultrastructurale ale celulelor din mezofilul foliolei de la trifoi (*Trifolium pratense*): A, B – martor – se observă celule asimilatoare normale, cu cloroplaste mari, cu granule de amidon tranzitoriu, cu citoplasmă densă şi fin granulată, C, D – Taşca gară – celule cu cloroplaste încărcate cu granule de amidon foarte mari, E – celulă lizată cu depuneri masive de polifenoli, F – celulă din mezofil cu polifenoli denşi în citoplasmă.

organitelor cu membrana duble (cloroplaste şi mitocondrii). În vecinătatea peretelui celular se observă, ca şi în cazurile anterioare, formaţiuni veziculare. Însă acumularea lor peste un anume prag duce la moarte celulară şi la necrozarea unei părţi variabile din mezofilul asimilator, cu repercusiuni importante asupra metabolismului foliar (fig. 46, 47).

De aceea considerăm că prezenţa compuşilor polifenolici cu localizare citoplasmatică sau vacuolară în cantităţi reduse, nedecelabile la microscopul fotonic, poate fi considerat un marker al expunerii frunzelor la acţiunea poluanţilor atmosferici, cu posibilitate de a se detecta precoce, înainte ca acţiunea sa asupra plantei să fie ireversibilă.

Cercetările de microscopie electronică cu baleiaj (S.E.M.) efectuate pe suprafeţele frunzelor de molid (*Picea abies*) provenite de la indivizi ce manifestau defolieri mai mult sau mai puţin accentuate, precum şi de la indivizi cu cloroze şi/sau necroze foliare au evidenţiat rolul, deloc de neglijat, al depunerilor străine în declanşarea acestor fenomene (Ivănescu şi Toma, 2003).

Depunerile masive de praf de var şi ciment pe suprafeţele frunzelor de la *Picea abies* investigată în zona Bicaz obturează ostiolele stomatelor, modifică relieful cuticular caracteristic prin dezorganizarea modelului striaţiilor cuticulare, modifică proporţia dintre ceara cristalizată şi cea

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

amorfă în favoarea celei din urmă care poate contribui, într-o anumită măsură, la obturarea ostiolelor, favorizează dezvoltarea unei microflore (fungi şi alge) care, odată instalată, acoperă porţiuni active fotosintetic şi poate elibera o serie de substanţe toxice ce afectează starea generală a frunzei.

Deşi unii autori consideră ca normală apariţia pe suprafeţele foliare a unei microflore, există şi opinii conform cărora instalarea acesteia constituie un semnal de alarmă care atenţionează asupra "suferinţelor" fiziologice accentuate, ce nu prezintă manifestare fenotipică în acest timp; deci, un alt posibil răspuns la controversata problemă a defolierilor masive ale arborilor.

Indiferent de natura chimică a noxei, prezenţa acestei microflore constituie un indicator al senescenţei timpurii a frunzelor şi o posibilă cauză a defolierilor ce au loc în plin sezon de vegetaţie. Este evident că, asemănător suprafeţelor foliare, şi microflora instalată este supusă impactului cu noxele industriale care-i pot inhiba sau, dimpotrivă, stimula extinderea (Ivănescu şi Toma, 2003).

Observarea prezenţei unei astfel de microflore doar pe suprafeţele foliare de la indivizi cu simptome variate de "suferinţă", cauzate în mod cert de poluanţii atmosferici, ne permite alăturarea constatărilor noastre la cele aparţinând autorilor care consideră drept "normală" apariţia acesteia pe frunzele indivizilor asupra cărora noxele acţionează sistematic. Coniferele sunt considerate principalele victime ale poluării atmosferice deoarece sunt extrem de specializate în extragerea apei din nori şi ceaţă, din care adsorb

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

ioni. Astfel, nu numai ploile acide, dar şi ceaţa, roua şi zăpada sunt potenţiali factori de agresiune. Factorii care cresc impactul poluanţilor asupra frunzelor de conifere sunt:

• lungimea medie mai mică a frunzelor aciculare de 1 an şi de 2 ani de la unele specii aflate în vecinătatea surselor de poluare;

• suprafaţa medie redusă a frunzelor.

Apariţia clorozelor şi a necrozelor în stadiile timpurii de dezvoltare a frunzelor, acumularea unor "suferinţe" fiziologice datorită carenţelor de nutriţie, agresiunea sistematică a noxelor, existenţa unor factori staţionali neprielnici se repercutează asupra gradului de dezvoltare a aparatului fotoasimilator al plantelor; suprafaţa medie redusă a frunzei (şi din cauza depunerilor şi din cauza necrozelor şi/sau clorozelor) este cauza principală a "înfometării cronice" a indivizilor care nu mai cresc, fructifică tot mai rar şi consumă din propriile rezerve organice din ce în ce mai scăzute cantitativ (Ivănescu şi Toma, 2003). Cloroze, necroze şi arsuri foliare de mărime variabilă, cu aspect punctiform, de pete sau benzi au fost observate cu precădere la vârful frunzelor aciculare.

Pe secţiuni transversale prin frunzele de molid (*Picea abies*) de la exemplarele-martor a fost observată structura histo-anatomică (fig. 48 – A, B), datele obţinute fiind asemănătoare cu cele din literatura de specialitate.

La probele recoltate din zona Carpatcement încărcare, în unele frunze s-au observat depuneri de tanin începând cu celulele epidermice (unele având lumenul plin), unele celule stomatice şi celule anexe, celule ale mezofilului, endodermei şi ţesutului de transfuzie din cilindrul central (fig. 48 – C, D). La probele recoltate din zona Taşca-gară modificările

BCU IAŞI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

structurale sunt mai puțin evidente, fiind vizibile unele depozite de culoare închisă (polifenoli) în celulele palisadice ale mezofilului frunzei (fig. 48 – E).

La molid au fost urmărite şi unele aspecte ultrastructurale ale țesutului asimilator. Celulele palisadice din frunzele recoltate de la martor prezintă o structură normală, cu reticul endoplasmic abundent localizat în apropierea membranei plasmatice, cu cloroplaste lenticulare situate parietal. Fiecare cloroplast prezintă numeroase granum-uri cu puține grana-tilacoide (5-7 per granum). Numărul de plastoglobuli este mai mare la probele recoltate din zonele afectate de poluare, în schimb numărul şi dimensiunile granulelor de amidon tranzitoriu scad la probele recoltate din aceste zone. Unele celule au cloroplaste ce prezintă tilacoizi uşor curbați. La nivelul citoplasmei se observă vezicule de mărimi diferite, provenite din invaginări ale plasmalemei care apare pe alocuri dezlipită de peretele celular (fig. 49).

În unele cazuri, la materialul colectat de la Carpatcement încărcare şi Taşca-gară au fost observate depozite electrono-dense localizate între peretele celular şi plasmalemă sau în apropierea plasmalemei.

De asemenea, unele celule sau grupe de celule din mezofil prezintă grade diferite de degenerescență. În concordanță cu observațiile făcute la microscopul fotonic şi celulele din componenta liberului sunt afectate, ceea ce sugerează un transport deficitar al nutrienților de la acest nivel. La frunzele din anii trecuți şi celulele parenchimului de transfuzie prezintă semne de degenerescență; datorită acestui fapt transferul sevei brute din vasele de lemn spre celulele țesutului asimilator este perturbat, deci funcția de fotosinteză nu se mai desfăşoară normal. Studiile recente din literatura de specialitate sugerează că la conifere modificările

BCU IAŞI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

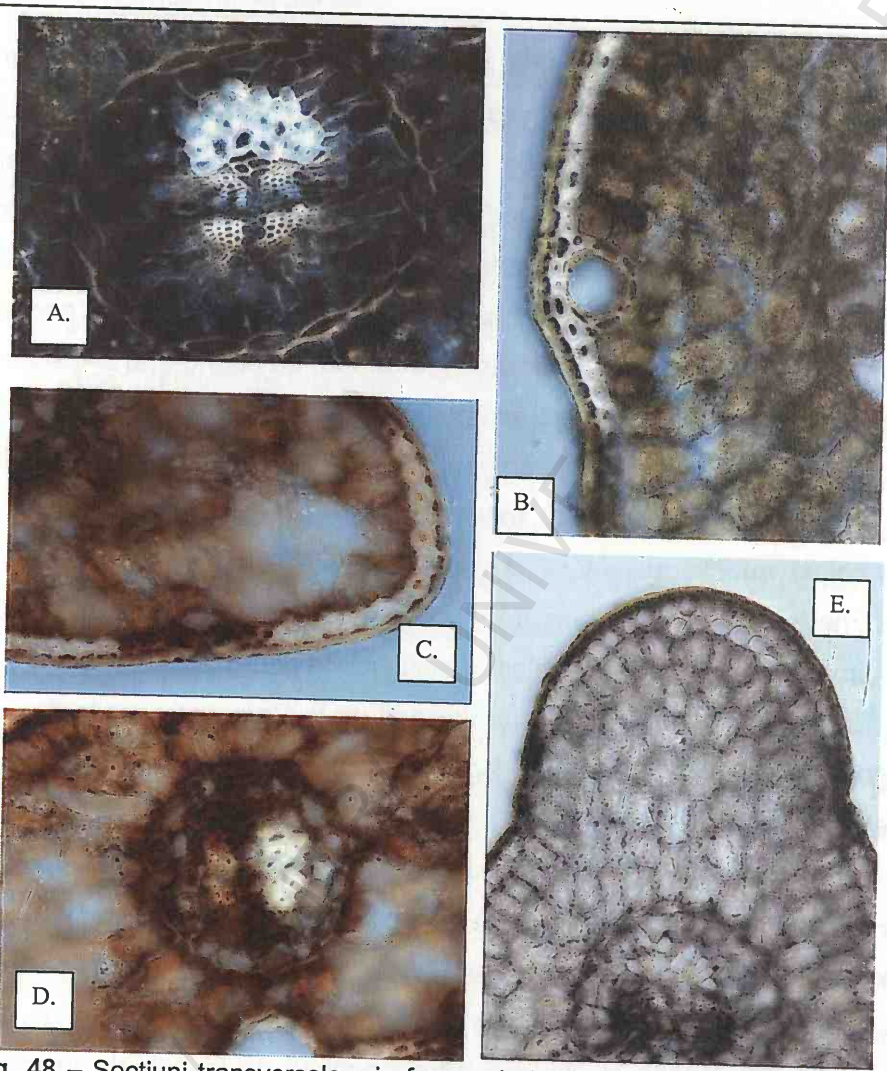


Fig. 48 – Secțiuni transversale prin frunza de la *Picea abies*: A, B – martor (A – detaliu din cilindrul central – în lumină polarizată, x 400, B – detaliu din mezofil şi canal secretor – x 200), C, D – Carpatcement încărcare (x200), E – Taşca-gară (x200).

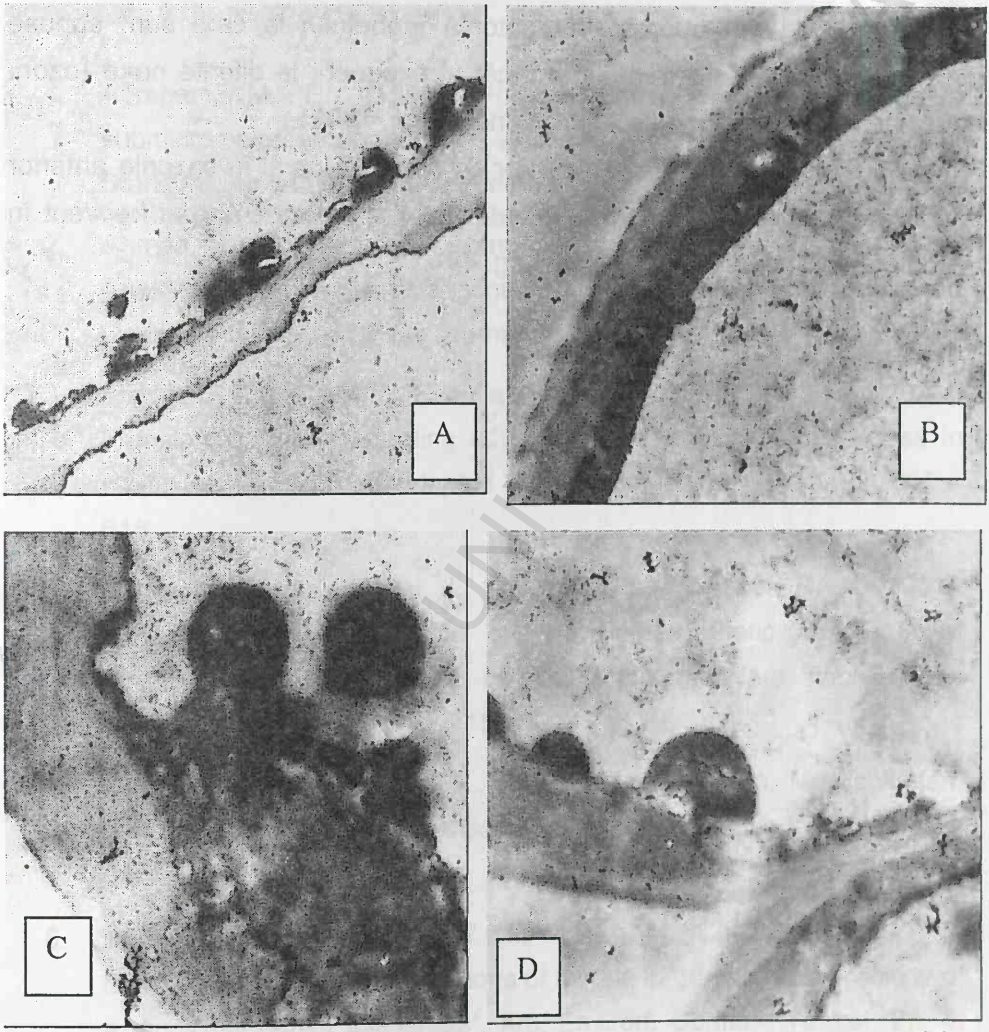


Fig. 49 – Depuneri de polifenoli evidențiate la microscopul electronic cu transmisie în frunzele de la *Picea abies* – Carpatcement încărcare: A, B – depuneri în lungul peretelui celular; C – aglomerări polifenolice şi liza organitelor celulare; D – depuneri lângă peretele celular.

ultrastructurale pot apărea atât datorită înghețului la care sunt supuse frunzele persistente mai mulți ani, cât şi expunerii la diferite noxe (ozon, ploi acide sau metale grele) (Holopainein et al. 1992).

În celulele țesutului asimilator se observă, ca şi în cazurile anterior analizate, depuneri polifenolice situate mai rar în vacuolă, mai frecvent în citoplasmă şi lângă pereții celulari (fig. 49).

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BIBLIOGRAFIE

1. Abraham, M. E., (1998). Physico-Chemical characterization of submicrometer indoor/outdoor aerosols, in PM2.5: A Fine Particle Standard. Air and Waste Management Association.
2. Ahmad S. H., Reshi Z., Ahmad J., Iqbal M., (2005). Morpho-Anatomical Responses of Trigonella foenum graecum Linn. to Induced Cadmium and Lead Stress Journal of Plant Biology, 48, 1, 64 – 84.
3. Alados C. L., Navarro T., Esco´ s J, Cabezudo B., Emlen J. M., (2001). Translational and fluctuating asymmetry as tools to detect stress in stress-adapted and nonadapted plants. Inter J Plant. Sci, 162, 607 – 616.
4. Appenroth, K.–J., Stockel, J., Srivastava, A., Stresser, R. J., (2001). Multiple effect of chromate on the photosynthetic apparatus of Spirodela polyrhiza probed by OIJP chlorophyll a fluorescence measurements', Env. Pollut, 115, 49.
5. Arndt U., Nobel W., Nobel E., (1987). Bioindikatoren. Moglichkeiten, Grenzen und neue Erkenntisse, Eugen Ulmer Verlag, Sttutgart, Germany.
6. Bache, C. A., Gutenmann, W. H., Rutzke, M., Chu, G., Elfving, DC. Lisk, D. J., (1991). Concentrations of metals in grasses in the vicinity of a municipal refuse incinerator', Arc. Environ. Contam. Toxicol, 20, 4, 538–542.
7. Bagchi S. K., Sharma V. P., Gupta P. K., (1989).Developmental instability in leaves of Tectona grandis. Silvae Genetica, 38, 1 – 6.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

8. Baker J. R., (1956). The Histochemical Recognition of Phenols, especially Tyrosine, Journal of Microscopical Science, 97, 2, 161-164.

9. Bargagli R., (1998). Mosses as passive and active biomonitors of trace elements, in R. Bargagli (ed.), Trace Elements in Terrestrial Plant, Springer-Verlag, Berlin.

10. Barz, W., Mackenbrock, U. (1994). Constitutive and elicitation induced metabolism of isoflavones and pterocarpans in chickpea (Cicerarietinum) cell suspension cultures. Plant Cell Tissue Organ Cult, 199-211.

11. Basile, A., Spagnualo, V., Alfano, F. and Castaldo Cobianchi, R., (1995). Effect of lead and colchicines on morphogenesis in the protenema of the moss Funaria hygrometrica, Ann Bot , 76, 6, 597-606.

12. Bassi, P., Basile, A., Stefenimi, A., Vosa, C. B., Maffie, M., Giordano, S. Castaldo Cobianchi, R., (2001). Effect of lead on the nuclear repetitive DNA of the moss Funaria hygrometrica (Funariales), Ann Bot, 87, 4, 537-543.

13. Bazynski, T., Krol, M., Wolinski, D., (1981). Photosynthetic apparatus of Lemna minor L. as affected by chromate treatment', in G. Akoyunoglou (ed), Photosynthesis II. Electron Transport and Photophosphorylation, Balaban International Science Service, Philadelphia.

14. Bermadinger E., Grill D., Golob P., (1988). Influence of different air pollutants on the structure of needle wax of spruce (Picea abies (L.) Karsten). Geojournal, 17, 289–293.

15. Bermadinger - Stabentheier E., (1995). Physical injury, re-crystallization of wax tubes and artefacts: identifying some causes of

BCU ASTU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

structural alteration to spruce needle wax, New Phytologist 130, 1, 67–74.

16. Bernards, M. A., Lewls, N. G., (1992). Alkyl ferulates in wound healing potato tubers. Phytochemistry, 31, 3409-3412.

17. Beggs, C. J., Kuhn, K., Bticker, R., Wellmann, E. (1987). Phytochrome-induced flavonoid biosynthesis in mustard (Sinapis alba L.) cotyledons: Enzymic control and differential regulation of anthocyanin and quercetin formation. Planta, 172, 121-126.

18. Bellinger E. G., Jones A. D., Tinker J., (1982). The character and dispersal of motorway run-off water. Water Pollut Contr, 81, 372 – 390.

19. Berg S. V., (1989). Leaf cuticles as potential markers of air pollutant exposure in trees. In: Biologic markers of air pollution stress and damage in forests, Committee on biological markers of air pollution damage in trees, National Research Council, National Academy Press, Washington D.C.

20. Bohnert H. J., Thomas J. C., DeRocher E. J., Michalowskl C. B., Brelteneder H., Krnon D. M., Deng W., Yamada S., Jensen, R. G., (1994). Responses to salt stress in the halophyte Mesembryanthemum crystallinum. In Biochemical and Cellular Mechanisms of Stress Tolerance in Plants, J.H. Cherry, ed (Berlin: Springer-Verlag), 414-425.

21. Brown D. H. Sidhu, M., (1992). Heavy metal uptake, cellular tolerance and inhibition of moss growth, Cryptogam Bot, 3, 82-92.

22. Burton, M. A. S., (1986). Biological monitoring of environmental contaminants (plants). MARC Report Number 32. Monitoring and Assessment Research Centre, King's College London, University of London.

BCU IAS / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

23. Cabral, J. P., (2003). Copper toxicity to five Parmelia lichens in vitro', Env Exp Bot, 49, 3, 237-250.

24. Carginale V., Sorbo S., Capasso C., Trinchella F., Cafiero G. Basile A., (2004). Accumulation, localization and toxic effects of cadmium in the liverworth Lunularia cruciata, Protoplasma, 223, 1, 53-61.

25. Choudhury S., Panda S. K., (2005) . Toxic Effects, Oxidative Stress and Ultrastructural Changes in Moss Taxithelium Nepalense (Schwaegr.) Broth. Under Chromium and Lead Phytotoxicity, 167, 1, 73-90

26. Christodoulakis N. S., Mitrakos K., (1987). Structural analysis of sclerophylly in eleven evergreen phanerophytes in Greece. In: NATO ASI series, GI5, Plant response to stress. Eds: Tenhunen JD et al. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.

27. Christodoutakis N. S., Fasseas C. (1990). Air Pollution Effects on the Leaf Structure of Laurus nobilis, an Injury Resistant Species Bull. Environ Contam Toxicol, 44, 276-281.

28. Clark, S. E., (1997). Organ formation at the vegetative shoot meristem. Plant Cell, 9, 1067-1 076.

29. Clarke G. (1992). Fluctuating asymmetry: a technique for measuring developmental stress of genetic and environment origin. Acta Zoo Fennica, 191,31 – 35.

30. Clarke G., (1993). Fluctuating asymmetry of invertebrate populations as a biological indicator of environmental quality. Environ Pollut, 82, 207 – 211.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

31. Coe, J. M., Lindberg S. E., (1987). The Morphology and Size Distribution of Atmospheric Particles Deposited on Foliage and Inert Surfaces." JAPCA 37, 237-245.

32. Cornelissen T., Stiling P., (2005). Perfect is best: low leaf fluctuating asymmetry reduces herbivory by leaf miners, Oecologia, 142, 1, 46-56.

33. Cowart N. M., Graham J. H., (1999). Within and among individual variation in fluctuating asymmetry of leaves in the fig (Ficus carica L.), International Journal of Plant Sciences, 160: 116–121.

34. Crossley A., Fowler D., (1986). The weathering of Scots pine epicuticular wax in polluted and clean air. New Phytologist, 103, 207-218.

35. Da Silva C. L., Oliva M., Azevedo A. A., Araújo J. M., Aguiar R. M., (2005). Micromorphological and anatomical alterations caused by simulated acid rain in Restinga plants: Eugenia uniflora and Clusia hilariana Water, Air, and Soil Pollution, 168, 129–143.

36. Deepak S., Agrawal M., (2001). Influence of elevated Co2 on the sensitivity of two soyabean cultivars to sulphur dioxide, Environ Exp Bot, 46, 81-91.

37. Dixon R. A., Paiva N. L., (1995). Stress-induced phenylopropanoid metabolism. Plant Cell, 7, 1085–1097.

38. Dolan L., Janmaat K., Willemsen V., Linstead P., Poethig R.S., Roberts K., Scheres,B., (1993). Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. Development, 119, 71-84.

39. Elkarmi A., Eideh R. A., (2006). Allometry of Urtica urens in Polluted and Unpolluted Habitats, Journal of Plant Biology, 49, 1, 9-15.

BCU ASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

40. Epstein E., Sagge O., Cohen J. D., Garty, J., (1986). Endogenous auxin and ethylene in the lichen Ramalina duriaei, Plant Physiol, 82, 1122-1125.

41. Ernst W. H. O., (1998). Effects of heavy metals in plants at cellular and organismic level. In G. Schuurmann & B. Markert (Eds.), Ecotoxicology, New York, Wiley & Sons, 587–620.

42. Evans L. S., (1984). Botanical aspects of acidic precipitation, Botanical Review, 50, 449– 490.

43. Fan H. B., Wang Y. H., (2000). Effects of simulated acid rain on germination, foliar damage, chlorophyll contents and seedling growth of five hardwood species growing in China, Forest Ecology and Management, 126, 321–329.

44. Freeman D. C., Graham J. H., Emlen J. M., (1993). Developmental stability in plants: Symmetries, stress and epigenesis. Genetica, 89, 97 – 102.

45. Freeman C. D., Brown L. M.,Duda J. J., Graraham H. J., Emlen J. M., Krzysik A. J., Balbach H., Kovacic D. A., Zak J. K., (2005). Leaf fluctuating asymmetry, soil disturbance and plant stress: a multiple year comparison using two herbs, Ipomoea pandurata and Cnidoscolus stimulosus Ecological Indicators, 5, 2, 85-95.

46. Garty J., Tamir O., Hassid I., Eshel A., Cohen Y., Karnieli A. and Orlovsky L., (2001). Photosynthesis, chlorophyll integrity, and spectral reflectance in lichens exposed to air pollution, J Env Qual, 30, 884-893.

47. Goldbold, D. L. and Kettner, C., (1991). Lead influences root growth and mineral nutrition of Picea abies seedlings, J Plant Physiol, 139, 95-99.

BCU/AS/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

48. Gonzalez C. M., Pignata M. I., (1994). The influence of air pollution on soluble proteins, chlorophyll degradation, MDA, sulfur and heavy metals in a transplanted lichen, Chem Ecol, 9, 105-113.

49. Gostin I., (2007). Morphological and structural changes in vegetative aerial organs from Lotus corniculatus under the air pollution action in Ceahlau National Park (CNP) and its adjacent area, SGEM Albena, iunie 2007.

50. Gostin I., (2007). Structural changes in leaves of Picea abies under the air pollution action in Ceahlau National park (CNP) and its adjacent area, Proceedings of International Symposium "The environment and the industry", Bucharest, 25-27 oct. 2007 , 1, 305-310.

51. Gostin I., Olteanu Z., Oprica L., (2007). Morphological, structural and biochemical modification induced by air pollutants in some Plantago species, Planta Medica, 1020.

52. Graham, J. H., Freeman D. C., Emlen J. M., (1993). Antisymmetry, directional asymmetry, and dynamic morphogenesis. Genetica, 89, 121-137.

53. Grill D., Pfeifhofer H., Halbwachs G., Waltinger H., (1987). Investigations on epicuticular waxes of differently damaged spruce needles. European Journal of Forest Pathology, 17: 246–255.

54. Guderian R., Tingey D. T., Rabe R., (1985). Effects of photochemical oxidants on plants, Air pollution by photochemical oxidants (ed) R. Guderian, Springer Verlag, Berlin.

55. Hagemann, W., Gleissberg, S. (1996). Organogenetic capacity of leaves: The significance of marginal blastozones in angiosperms. Plant Syst Evol, 199, 121-152.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

56. Harborne J. B., ed (1988). The Flavonoids: Advances in Research since 1980. (New York: Chapman and Hall).

57. Heller W., Forkmann, G., (1988). Biosynthesis. In The Flavonoids: Advances in Research since 1980, J.B. Harborne, ed (New York: Chapman and Hall), 399-425.

58. Hendrickx F., Maelfait J. P., Lens L., (2003). Relationship between fluctuating asymmetry and fitness within and between stressed and unstressed populations of the wolf spider Pirata piraticus. J Evol Biol, 16, 1270 – 1279.

59. Hernández L. F., Green, P. B. (1993). Transductions for the expression of structural pattern: Analysis in sunflower. Plant Cell, 5, 1725-1738.

60. Herrmann K. M., (1995). The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. Plant Cell, 7, 907-919.

61. Heumann H. G., (2002). Ultrastructural localization of zinc in zinc-tolerant Armeria maritime ssp. halleri by autometallography. Journal of Plant Physiology, 159, 191–203.

62. Hochwender C. G., Fritz R. S., (1999). Fluctuating asymmetry in a Salix hybrid system: the importance of genetic versus environmental causes. Evolution 53, 408 – 416.

63. Hodar J., (2002). Leaf fluctuating asymmetry of Holm oak in response to drought under contrasting climatic conditions. J. Arid Environ, 52, 233 – 243.

64. Holton T. A., Cornish, E. C. (1995). Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis. Plant Cell, 7, 1071-1083.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

65. Hopp, W., Sietz, H. U. (1987). The uptake of acylated anthocyanin into isolated vacuoles from a cell suspension culture of Daucus carota. Planta, 170, 74-85.

66. Ivanescu L., Toma C., (2003). *Influența poluării atmosferice asupra structurii plantelor,* Ed. Fundației Andrei Şaguna, Constanța.

67. Ivanescu L., Zamfirache M., (2005). Some aspects concerning the reply reactions of some Gymnosperms to the action of solid industrial pollutants, in vol. „International Conference of modern management of Mine Producing, Geology and Environmental Protection", Albena, Bulgaria, 13-17 June: 405-411.

68. Ivanescu L., Gostin I., (2007). Cito-histological changes due to the action of atmosphere pollutants on three species of gymnosperms, Lecture and Notes on Energy and Environment (proceedings EPESE 2007), 234-240.

69. Jacobs T., (1997). Why do plant cells divide? Plant Cell, 9, 1021-1029.

70. Jackson D., Veit B., Hake S., (1994). Expression of maize KNOTTED7-related homeobox genes in the shoot apical meristem predicts the patterns of morphogenesis in the vegetative shoot. Development 120, 405-413.

71. Jarvis M. D., Leung D. W. M. (2001). Chelated lead transport in Chamaecytisus proliferus (L.f.) link ssp. Proliferus var. palmensis (H. Christ): An ultrastructural study. Plant Science, 161, 433–441.

72. Jonsson L. M. V., Donker-Koopman W. E., Ultslager P., Schram E., (1983) Subcellular localization of anthocyanin methyltransferase in flowers of Munia hybrida. Plant Physiol, 72, 287-290.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

73. Johnson D. L., Nowak D.J., Jouraeva V.A., (1999). Characterizing Individual Particles on Tree Leaves Using Computer Automated Scanning Electron Microscopy." Adv. In Environmental Research 2: 456-466.

74. Jurca E. M., (2005). Raport de carcetare la proiectul Td: Studiul influenței metalelor grele şi a aluminiului în suspensii celulare la Nicotiana tabacum şi Arabidopsis thaliana. Revista de Politica Stiintei si Scientometrie - Numar Special.

75. Kende H., Zeevaart J. A. D., (1997). The five "classical" plant hormones. Plant Cell, 9, 1197-1210.

76. Kerstetter R. A., Hake S. (1997). Shoot meristem formation in vegetative development. Plant Cell, 9, 1001-1010.

77. Kerstiens G., (1994). Air pollutants and Plant cuticles: Mechanisms of gas and water transport, and effects on water permeability', in: K. Percy, J. N. Cape, R. Jagels and C. J. Simpson (eds.), Air Pollutants and the Leaf Cuticle, Springer-Verlag, Germany.

78. Kropf D. L., (1997). Induction of polarity in fucoid zygotes. Plant Cell, 9,1011-1020.

79. Kozlov M. V., Wilsey B. J., Koricheva J., Haukioja E., (1996). Fluctuating asymmetry of birch leaves increases under pollution impact. J. Appl. Ecol., 33, 1489 – 1495.

80. Kozlowski, T. T., (1980). Impacts of air pollution on forest ecosystems, BioScience, 30, 89–93.

81. Krausman, P., (1999)., Some basic principles of habitat use. In: Launchbaugh K. L, Sanders K. D, Mosley J. C, editors. Grazing

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

behavior of livestock and wildlife. Idaho forest wildlife and range exp. sta. bull. 70, Univ Idaho, Moscow ID.

82. Lajus D. L., Graham J. H., Kozhara A. V., (2003). Developmental instability and the stochastic component of total phenotypic variance. Pages 343-363 In: M. Polak (editor), Developmental instability: causes and consequences. Oxford University Press, New York.

83. Larcher W. (1995). Physiological plant ecology: Ecophysiology and stress physiology of functional groups. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.

84. Lazar G., 2002. Mecanisme de toleranță a plantelor la metale. Proceedings of 8th International Conference University's Day Târgu Jiu, May 24-26.

85. Laux T., Jurgens G. (1997). Embryogenesis: A new start in life. Plant Cell, 9, 989-1000.

86. Leary R. F., Allendorf F. W., (1989). Fluctuating asymmetry as an indicator of stress; implications for conservation biology. Trends Ecol Evol, 4, 214 – 217.

87. Lentzian K. J., Unsworth M. H., (1983). Ecophysological effects of atmospheric pollutants. In: Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Ziegler H. (eds) Encyclopedia of Plant Physiology Vol 120. Springer Verlag, Berlin, 465-502.

88. Lewis N. G., Yamamoto E., (1990). Lignin: Occurence, biogenesis and biodegradation. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol, 41, 455-496.

89. Lois R., (1994). Accumulation of UV-absorbing flavonoids induced by UV-B radiation in Arabidopsis thaliana L. I. Mechanisms of UVresistance in Arabidopsis. Planta 194, 498-503.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

90. Long J. A., Moan E. I., Medford, J. I., Barton, M. K., (1996). A member of the KNOTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of Arabidopsis. Nature, 379, 66-69.

91. Loponen J., Ossipov V., Koricheva J., Haukioja E., Pihlaja K., (1997). Low molecular mass phenolics in foliage of Betula pubescens Ehrh. in relation to aerial pollution. Chemosphere, 34, 687–697.

92. Lu B., Villani P. J., Watson J. C., DeMason D. A., Cooke, T. J., (1996). The control of pinna morphology in wildtype and mutant leaves of the garden pea (Pisum sativum L.). Int. J. Plant Sci. 157, 659-673.

93. Malamy J. E., Benfey P.N., (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana, Development 124, 33-44.

94. McConnell J. R., Barton M. K., (1995). Effect of mutations in the P/NHEAD gene of Arabidopsis on the formation of shoot apical meristems. Dev. Genet. 16, 358-366.

95. Mansfield T. A., (1998). Stomata and plant water relations: does air pollution create problems?, Environmental Pollution, 101, 1, 1-11.

96. Martel J, Lempa K, Haukioja E., (1999). Effect of stress and rapid growth on fluctuating asymmetry and insect damage in birch leaves. Oikos 86, 208 – 216.

97. Market B., Oehlmann J., Roth M., (1997). General aspects of heavy metal monitoring by plants and animals. In: Environmental monitoring: Exposure, assessment and specimen banking, Subramanian, K.S. and Lyengar, G.V. (eds.), ACS Symposium series 654. American Chemical Society.

BCU IASTI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

98. Matthews R. A., Buikema Jr. A.L., Cairns Jr. J., Rodgers, Jr. J. H., (1982). Biological monitoring. Part IIA. Receiving system functional methods, relationships and indices. Water Research, 16, 129-139.

99. Măciucă A., (2003). Aspecte privind utilizarea bioindicatorilor în supravegherea ecosistemelor. Bucovina forestieră, 9, 1, 53-58.

100. Møller A. P., Swaddle J. P., (1997). Asymmetry, developmental stability and evolution. New York: Oxford University Press.

101. Møller A. P., (1997). Developmental selection against developmentally unstable offspring and sexual selection. J Theor Biol, 185, 415 – 422.

102. Møller A. P., Eriksson M., (1994). Patterns of fluctuating asymmetry in flowers: implications for sexual selection in plants. J Evol Biol, 7, 97 – 113.

103. Møller A. P., Eriksson M., (1995). Pollinator preference for symmetric flowers and sexual selection in plants. Oikos, 73, 15 – 22.

104. Moustakas M., Lanaras T., Symeonidis L., Karataglis S., (1994). Growth and some photosynthetic characteristics of field grown Avena sativa under copper and lead stress, Photosynthetica, 30, 389.

105. Muzika R. M., Guyette R. P., Zielonka T., Liebhold A. M. (2004). The influence of O3, NO2 and SO2 on growth of Picea abies and Fagus sylvatica in the Carpathian Mountains, Environmental Pollution, 130, 1, 65-71.

106. Nelson T., Dengler, N. (1997). Leaf vascular pattern formation. Plant Cell, 9, 1121-1135.

107. Ormrod D. L., Black V. J., Unsworth M. H., (1981). Depression of net photosynthesis in Vicia faba L. exposed to sulphur dioxide and ozone. Nature, 291, 585-586.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

108. Panda, S. K., (2003). Heavy metal phytotoxicity induces oxidative stress in a moss, Taxithellium sp., Curr Sci 84(5), 631.

109. Panda S. K., Patra H. K., (2000). Does chromium (III) produces oxidative damage in excised wheat leaves? J Plant Biol, 27, 105-110.

110. Panda S. K., Chaudhury I., Khan, M. H., (2003). Heavy metal induced lipid peroxidation and affect antioxidants in wheat leaves, Biol Plant, 46, 2, 289-294.

111. Paoletti E., Nali C., Lorenzini G., (2007). Early responses to acute ozone exposure in two Fagus sylvatica clones differing in xeromorphic adaptations: photosynthetic and stomatal processes, membrane and epicuticular characteristics, Environ Monit Assess, 128, 93–108.

112. Parsons P. 1992. Fluctuating asymmetry: a biological monitor of environmental and genetic stress. Heredity, 68, 361 – 364.

113. Patel J. D., Devi G. S., (1984). Ultrastructural variations in leaves of Streblus asper growing near a fertilizer complex. Phytomorphology, 34, 140-146.

114. Pennell R.I ., Lamb C., (1997). Programmed cell death in plants. Plant Cell, 9, 1157-1168.

115. Percy K., (1986). The effects of simulated acid rain on germinative capacity, growth and morphology of forest tree seedlings, The New Phytologist 104, 473–484.

116. Percy K. E., Awmack C. S., Lindroth R. L., Kubiske M. E., Kopper B. J., Isebrands J. G., (2002). Altered performance of forest pests under atmospheres enriched by CO2 and O3. Nature, 420, 403–407.

117. Potts M., (1994). Desiccation tolerance in prokaryotes. Microbiol. Rev., 58, 755-805.

BCU ASU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

118. Psaras G. K., Christodoulakis N. S., (1987). Air pollution affects on thee ultrastructure of Phlomis fruticosa mesophyll cells. Bull Environ Contam Toxicol, 38, 610-617.

119. Rasmussen J. B., Hammerschmidt R., Zook M. N., (1991). Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with Pseudomonas syringae pv syringae. Plant Physiol, 97, 1342-1347.

120. Rauser W.E., Ackerley C.A., (1987). Localization of cadmium in granules within differentiating and mature root cells. Can J Bot, 65, 643–646.

121. Reid R. J., Dunbar K. R., McLaughlin M. J., (2003). Cadmium loading into potato tubers: the roles of the periderm, xylem and phloem. Plant, Cell and Environment, 26, 201–206.

122. Riding R. T., Percy K. E., (1985). Effects of SO2 and other air pollutants on the morphology of epicuticular waxes on needles of Pinus strobus and Pinus banksiana, New phytologist, 99, 555-563.

123. Roy B. A., Stanton M. L., (1999). Asymmetry of wild mustard, Sinapis arvensis (Brassicaceae), in response to severe physiological stresses. Journal of Evolutionary Biology 12, 3, 440-449.

124. Sakai K, Shimamoto Y., (1965). Developmental instability in leaves and flowers of Nicotiana tabacum, Genetics, 51, 101 – 113.

125. Sakihama Y., Cohen M. F., Grace S. C., Yamasaki H., (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: Phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. Toxicology, 177, 67–80.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

126. Sandalio L. M., Dalurzo H. C., Gomez M., Romero-Puertas M. C., del Rio, L. A., (2001). Cadmium induced changes in growth and oxidative metabolism of pea plants, J Exp Bot, 52, 2115-2126.

127. Santiago L. J. M., Louro, R. P., De Oliveira, D. E. (2000). Compartmentation of phenolic compounds and phenylalanine ammonia-Lyase in leaves of Phyllanthus tenellus Roxb. and their induction by copper sulphate. Ann Bot, 86, 1023–1032.

128. Sattler R., Maier U. (1977). Development of epiphyllous appendages of Begonia hispida var. cucullifera: Implications for comparative morphology. Can J Bot, 55, 41 1-425.

129. Saxena D. K., Saxena A., Srivastava, H. S., (1999). Heavy metal accumulation and in vivo nitrate reductase activity in the Sphagnum squarrosum Carm. Samnl., Proc. Nat. Acad. Sci. India, 69, 307-312.

130. Schiefelbein J. W., Masucci J. D., Wang, H. (1997). Building a root: The control of patterning and morphogenesis during root development. Plant Cell, 9, 1089 -1098.

131. Schmelzer E., Krüger-Lebus S., Hahlbrock K. (1989). Temporal and spatial patterns of gene expression around sites of attempted fungal infection in parsley leaves. Plant Cell, 1, 993-1001.

132. Schreuder M. D. J., van Hove L. W. A., Brewer C. A. (2001). Ozone exposure affects leaf wettability and tree water balance. New Phytologist, 152, 443–454.

133. Selker J. M. L., Lyndon R. F., (1996). Leaf initiation and de novo pattern formation in the absence of an apical meristem and preexisting patterned leaves in watercress (Nasturtium officinale) axillary explants. Can J Bot, 74,625-641.

BCU/INST/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

134. Seregin I. V., Ivanov V. B., (2001). Physiological aspects of cadmium and lead toxic effects on higher plants. Russian Journal of Plant Physiology, 48, 523–544.

135. Singh A., Agrawal M., (1996). Responses of two cultivars of Triticum aestivum L. to simulated acid rain, Environmental Pollution, 91, 161–167.

136. Singh R. K., Dutta R. K., Agrawal, M., (2004). Litter decomposition and nutrient release in relation to atmospheric deposition of S and N in a dry tropical region, Pedobiologia, 48, 305–311.

137. Sherry R. A., Lord E. M., (1996). Developmental stability in leaves of Clarkia tembloriensis (Onagracea) as related to population outcrossing rates and heterozygosity. Evolution, 50, 80 – 91.

138. Shparyk Y. S., Parpan V. I., (1990). Heavy metal pollution and forest health in Ukrainian Carpathians, Environ Pollut, 130, 55–63.

139. Smith W. H., (1981). Air pollution and forests, Springer Verlag New York.

140. Soikkeli S., Karenlampi, L. (1984). Cellular and ultrastructural effects. In M. Treshow (Ed.), Air pollution and plant life. Chichester, New York: Wiley.

141. Soukupova J., Cvikrova M., Alberchtova J., Rock B. N., Eder J., (2000). Histochemical and biochemical approaches to the study of phenolic compounds and peroxidases in needles of Norway spruce (Picea abies) New Phytologist, 146, 3, 403–414.

142. Souto C., Pellissier F., Chiapusio G. (2000). Allelopathic effects of humus phenolics on growth and respiration of mycorrhizal fungi. Journal of Chemical Ecology, 26, 2015–2023.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

143. Stefanowska M., Kuraś M., Kacperska A., (2002). Low temperature-induced modifications in cell ultrastructure and localization of phenolics in winter oilseed rape (Brassica napus L. var. oleifera L.) leaves. Ann Bot, 90, 637–645.

144. Stephan UW, Scholz G., (1993). Nicotianamine: mediator of transport of iron and heavy metals in the phloem? Physiologia Plantarum, 88, 522–529.

145. Terao J., Piskuła M., Yao Q. (1994). Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. Archives of Biochemistry and Biophysics, 308, 278–284.

146. Tingey D.T., (1989). Bioindicators in air pollution research - applications and constraints. In: Biologic markers of air pollution stress and damage in forests, Committee on biological markers of air pollution damage in trees. National Research Council, National Academy Press, Washington D.C.

147. Tiwari S.C., Green, P.B., (1991). Shoot initiation on a Graptopetalum leaf Sequential scanning electron microscopic analysis for epidermal division patterns and quantitation of surface growth (kinematics). Can J Bot, 69, 2302-2319.

148. Tong, Y.-P., Kneer, R., & Zhu, Y.-G., (2004). Vacuolar compartmentalization: A second generation approach to engineering plants for phytoremediation. Trends in Plant Science, 9, 7–9.

149. Wagner G. J., (1993). Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health. Advances in Agronomy 51,173–212.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

150. Valentine D., Soule M., Sammolow P., (1973). Asymmetry analysis in fishes: a possible statistical indicator of environmental stress. Fish Bull, 71, 357 – 370.

151. Van Belleghem F., Cuypers A., Semane G., Smeets K., Vangronsveld J., d'Haen J., Valcke J., (2007). Subcellular localization of cadmium in roots and leaves of Arabidopsis thaliana, New Phytologist, 173 ,3, 495–508.

152. Van den Berg, C., Willemsen, V., Hage, W., Weisbeek, P., and Scheres B., (1995). Cell fate in the Arabidopsis root meristem determined by directional signaling. Nature, 378, 62-65.

153. Vázquez M.D., Poschenrieder Ch., Barceló J., (1992). Ultrastructural effects and localization of low cadmium concentrations in bean roots. New Phytol. 120, 215–226.

154. Vázquez M. D., Poschenrieder Ch., Barceló J., Baker A. J. M., Hatton, P., Cope, G. H., (1994). Compartmentation of zinc in roots and leaves of the zinc hyperaccumulator Thlaspi caerulescens J. et C. Presl. Bot. Acta 107, 243–250.

155. Velikova V., Yardanov I., Edreva A., (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants, Plant Science, 151, 59–66.

156. Velickovic M., Perisic S., (2006). Leaf fluctuating asymmetry of common plantain as an indicator of habitat quality, Plant Biosystems, 140, 2,138-145.

157. Vilardell J., Martinez-Zapater J. M., Goday A., Arenas C., Pags M. (1994). Regulation of the rab77 gene promoter in transgenic

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Arabidopsis wild-type, ABA-deficient and ABA-insensitive mutants. Plant Mol Biol, 24, 561-569.

158. Vincent C. D., Lawlor A. J., Tipping E., (2001). Accumulation of Al, Mn, Fe, Cu, Zn, Cd and Pb by the bryophyte Scapania undulate in three upland waters of different pH , Environmental pollution, 114, 1, 93-100.

159. Vogeli – Lange, R., Wagner J.G., (1990). Subcellular localisation of cadmium and cadmium binding peptides in tobacco leaves: implications of transport function for Cd – binding peptided. Plant Physiol, 92, 1086 – 1093.

160. Vogt T., Pollak P., Tarlyn N., Taylor L. P. (1994). Pollinationor woundinduced kaempferol accumulation in petunia stigmas enhances seed production. Plant Cell, 6, 11-23.

161. Zobel A. M., Nighswander, J. E., (1990). Accumulation of phenolic compounds in the necrotic areas of Austrian and red pine needles due to salt spray. Ann Bot, 66, 629–640.

162. Yalpani N., Ledn J., Lawton M. A., Raskin I., (1993). Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. Plant Physiol, 103, 315-321.

163. Yalpani N., Enyedi A.J., Ledn J., Raskin I., (1994). Ultraviolet light and ozone stimulate accumulation of salicylic acid, pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco. Planta, 193, 372-376.

164. Witzell J., Gref R., Torgny N. (2003). Plant - part specific and temporal variation in phenolic compounds of boreal bilberry (Vaccinium myrtillus) plants. Biochemical Systematics and Ecology, 31, 115–127.

165. Whetten R., Sederoff, R. (1995). Lignin biosynthesis. Plant Cell, 7, 1001-1013.

BCU MAIN CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

166. Wierzbicka M., (1998). Lead in apoplast of Allium cepa L. Root tips – Ultrastructural studies. Plant Science, 133, 105–109.

167. Witzell J., Shevtsova A., (2004). Nitrogen-induced changes in phenolics of Vaccinium myrtillus – Implications for interaction with parasitic fungus. Journal of Chemical Ecology, 30, 1937–1956.

168. Wójcik M, Tukiendorf A. (2005). Cadmium uptake, localization and detoxification in Zea mays. Biologia Plantarum, 49, 237–245.

169. Wu S.-C., Hahlbrock K., (1992). In situ localization of phenylpropanoid-related gene expression in different tissues of lightand dark-grown parsley seedlings. Z. Naturforsch, 47, 591-600.

170. Wulff A., Kärenlampi L. (1996). Effects of long-term open-air exposure to fluoride, nitrogen compounds and SO2 on visible symptoms, pollutant accumulation and ultrastructure of Scots pine and Norway spruce seedlings. Trees 10: 157-171.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Irina Gostin

BIOMARKERI STRUCTURALI LA PLANTE

www.editura.uaic.ro

9789737032911

Editura Universității „Alexandru Ioan Cuza" Iași

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY